ORSAY

Série A,
N° D'ordre
184

THESES

Présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

CENTRE D'ORSAY

Pour obtenir

le Titre de Docteur ES-SCIENCES

par

CLEMENT née METRAL Jenny

1ère Thèse : "Contribution à l'étude cinétique et thermodynamique de l'inhibition de l'hydrolyse trypsique de la β-Lactoglobuline A, en présence de quelques sucres".

2ème Thèse : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 28 Juin 1966, devant la Commission d'Examen

MM. J. TONNELAT - Président

J. LAVOREL
Melle YON } Examinateurs

J. TREMOLIERES

ORSAY

Série A,
N° D'ordre
184

THESES

Présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

CENTRE D'ORSAY

Pour obtenir

le Titre de Docteur ES-SCIENCES

par

CLEMENT née METRAL Jenny

1ère Thèse : "Contribution à l'étude cinétique et thermodynamique de l'inhibition de l'hydrolyse trypsique de la β-Lactoglobuline A, en présence de quelques sucres".

2ème Thèse : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 28 Juin 1966, devant la Commission d'Examen

MM. J. TONNELAT - Président

J. LAVOREL
Melle YON } Examinateurs

J. TREMOLIERES

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A la Mémoire de mon Premier Maître

Monsieur le Professeur C. FROMAGEOT

A Messieurs les Professeurs

LEAUTE, Membre de l'Institut
LEMOIGNE, Membre de l'Institut
JUSTIN-BESANCON
BUGNARD

A Monsieur E. BRICAS

A Monsieur le Professeur agrégé P. CARTIER

en témoignage de ma reconnaissance.

A la Mémoire de mon Père le Professeur A.R. METRAL

dont la haute intelligence, la scrupuleuse honnêteté et la rigueur morale seront toujours pour moi le modèle de l'esprit scientifique.

A DANIEL

sans lequel ce travail n'aurait jamais été fait.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549020_0024

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Nutrition Humaine de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Je suis infiniment reconnaissante à Monsieur le Recteur J. ROCHE d'avoir bien voulu me présenter à Monsieur le Professeur J. TREMOLIERES, Directeur de ce Laboratoire, qui a eu la bonté de m'y accueillir et de m'autoriser à y poursuivre ces recherches sous sa direction éclairée, ce dont je le remercie vivement.

Monsieur le Professeur J. TONNELAT, qui a bien voulu accepter la présidence de cette thèse m'a toujours montré la plus grande bienveillance. Son enseignement et ses précieux conseils m'ont été d'un grand secours. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur J. LAVOREL qui, malgré toutes ses occupations, a accepté de me faire l'honneur d'être membre du Jury de ma thèse.

Je dois à Mademoiselle YON, à ses encouragements et à son dynamisme, outre le sujet de cette thèse, une reconnaissance émue pour l'intérêt qu'elle a montré à ce travail, ses conseils judicieux et l'élan qu'elle a imprimé à mes recherches.

Je tiens tout particulièrement à remercier tous ceux qui m'ont si simplement et avec tant de gentillesse, au Laboratoire de Biologie Physico-Chimique de la Faculté des Sciences d'Orsay, en poussant l'amitié jusqu'à me faire oublier que j'étais une intruse les dérangeant dans leur travail, appris tant de choses diverses.

Je n'oublie pas tous mes collègues et amis du Laboratoire de Nutrition Humaine et tout spécialement le "labo 29" que je remercie pour l'atmosphère cordiale et sympathique qu'ils ont su y créer.

INTRODUCTION

On conçoit qu'un grand nombre de facteurs puisse modifier le cours du déroulement d'une réaction enzymatique. En particulier, l'introduction, dans un milieu aussi complexe dans lequel toutes les molécules sont à des degrés divers en interaction mutuelle, d'un élément nouveau capable de modifier ces interactions en en créant d'autres entraîne une variation dans la vitesse. C'est pourquoi l'emploi des inhibiteurs dans l'étude des réactions enzymatiques a donné tant de résultats intéressants. En effet, si l'on peut connaître la modification de structure, de charge, de conformation ..... qu'entraîne la liaison de l'inhibiteur avec l'une des protéines du milieu (dans le cas qui nous occupe de l'action de la trypsine), et relier cette modification à celle de la vitesse, on doit pouvoir obtenir des renseignements précieux sur le mécanisme réactionnel.

Or, si la liaison des protéines avec les ions H^+ et certains petits ions a été particulièrement bien étudiée, les travaux qui rendent compte de liaisons avec de petites molécules neutres sont beaucoup plus rares. On sait, cependant, tout l'intérêt actuel de l'étude de nombreux "ligands" qui entraînent sur les protéines à fonction biologique sur lesquelles ils se lient, des phénomènes d'interaction allostérique homo ou hétérotrope qui s'accompagnent de transconformations. Cette étude entreprise par J. WYMAN dès 1948 (1,2) a été reprise depuis par de nombreux auteurs dont MUIRHEAD et PERUTZ (3), BENESCH et BENESCH (4) et J. MONOD et al. (5,6).

L'étude de l'inhibition de la protéolyse trypsique de la Lactoglobuline par les sels a permis à J. YON de montrer que l'inhibition observée résulte d'interactions de diverses natures qui pourraient intervenir au niveau de la protéine-substrat (7,8). Ces travaux, associés à ceux de LUCK et coll. (9-11) qui ont établi que les sucres empêchaient la dénaturation des protéines par la chaleur, nous ont conduit à étudier l'influence des sucres et plus particulièrement du Saccharose sur la protéolyse trypsique de la β-Lactoglobuline A.

Après avoir mis en évidence une inhibition, nous avons essayé d'en atteindre le mécanisme. A la suite des travaux récents de J. YON et coll. (12-15), de DESNUELLE et son équipe (16), de BENDER et coll. (17-20) sur l'activité trypsique, nous avons voulu préciser le type apparent d'inhibition, l'existence d'une liaison sucre-protéine, la protéine (substrat ou enzyme) sur laquelle se liait le sucre, la nature de la liaison sucre-protéine, et déterminer dans la mesure du possible les constantes d'association.

Nous avons conduit notre étude d'après le plan suivant :

P L A N

INTRODUCTION

CHAPITRE I - RAPPEL DE NOTIONS THEORIQUES.

I_1) - Cinétique des réactions enzymatiques. Cas de la Trypsine.

I_2) - Théorie de l'inhibition réversible des réactions enzymatiques.

I_{2I}) Réaction de l'inhibiteur avec E ou ES. Différents types d'inhibition.

I_{211}) - Cas de l'équilibre

I_{212}) - Cas de l'état stationnaire

I_{22}) Réaction de l'inhibiteur avec le substrat.

I_{221}) Inhibition par réduction de la concentration des différents constituants.

I_{222}) Inhibition par formation d'un complexe SI.

I_{23}) Plusieurs molécules se lient à l'enzyme.

I_{24}) Plusieurs molécules se lient au substrat.

I_3) Réaction de l'inhibiteur avec le milieu.

CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES UTILISEES.

CHAPITRE III - RESULTATS.

III_1) Mise en évidence d'une inhibition.

III_2) Influence de variations dans la constitution du milieu.

III_3) Etude cinétique.

III_{31}) Modes de représentation graphique, théoriques.

III_{32}) Résultats de l'étude cinétique.

III_{32I}) L'inhibition conserve le phénomène d'activation par le substrat.

III_{322}) L'inhibition se fait par liaison Sucre-Protéine. Elle est liée à la nature protéique du substrat.

III_{323}) L'inhibition est du type totalement non compétitif.

III_{324}) La protéine lie plusieurs molécules de Saccharose.

III_4) Nature de la liaison.

III_{41}) Elle est très rapide

III_{42}) Nombre de molécules de Saccharose fixées à la protéine.

III_{43}) La liaison est-elle polaire ?

III_{44}) Cette liaison s'accompagne d'un changement de conformation de la protéine à pH = 7.

III_5) Influence du pH.

III_6) Influence de la température.

III_{61}) Conservation de l'activation par le substrat.

III_{62}) Détermination des constantes.

III_7) Action de différents autres sucres.

DISCUSSION.

CONCLUSION.

BIBLIOGRAPHIE.

CHAPITRE I

RAPPEL DE NOTIONS THEORIQUES

I_1) Cinétique des réactions enzymatiques. Cas de la Trypsine

On s'accorde généralement à penser, à la suite des travaux des équipes de BENDER (17-20), YON (12-15) et DESNUELLE (16), que l'hydrolyse trypsique des esters labiles et des substrats spécifiques simples se fait selon un schéma à plusieurs étapes, du type :

$$E + S \rightleftharpoons ES_1 \rightleftharpoons ES_2 \;\ldots\; ES_n \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$$

ou ES_1 serait le complexe d'adsorption enzyme-substrat,

$ES_2 \ldots ES_n$ des complexes de "transconformation" ou des intermédiaires chimiques tels que l'"Acyl-Enzyme",

EP le complexe d'adsorption enzyme-produits.

On admet que la décomposition de la plupart de ces intermédiaires est rapide et ne peut être un processus limitant. On peut donc simplifier le schéma de la façon suivante :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} ES' \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E + P$$

avec ES complexe d'adsorption enzyme-substrat
ES' "Acyl-Enzyme"

Quoi que l'on n'en ait encore aucune preuve et malgré les critiques de BERNHARD (21), on peut penser que ce schéma est

applicable à l'hydrolyse d'une protéine. En effet, BERNHARD et ses collaborateurs critiquent l'utilisation de modèles non spécifiques pour la détermination du mécanisme de l'activité catalytique en se basant sur le fait que le spectre d'absorption U.V. des Acyl-Enzymes est très différent de ceux des modèles. Ils reconnaissent cependant que le phénomène observé avec le modèle a toutes les chances d'être considérablement modifié lorsqu'il se produit au sein d'une protéine. De plus, tout récemment, BRANDT et HESS (22) en étudiant les vitesses à l'état pré-stationnaire ont démontré que le schéma ci-dessus, établi pour le p-phényl Acétate, était valable pour les substrats spécifiques.

Pour exprimer la vitesse de la réaction, on peut faire appel à deux modes de calcul différents. Ils conduisent tous deux à l'expression classique de MICHAELIS-MENTEN :

$$v = \frac{V_m\ (S)}{K_m + (S)}$$

V_m, la vitesse maximum et K_m la constante de MICHAELIS, ne sont plus que des constantes apparentes exprimées en fonction des différentes constantes de vitesse et sans signification physique, qui deviennent :

1) - Si l'on suppose qu'il existe un pseudo-équilibre entre les différents complexes et leurs composants :

$$(1) \qquad V_m = \frac{k_3\ (E_t)}{1 + K'_s} \qquad K_m = \frac{K_s\ K'_s}{1 + K'_s}$$

(E_t) = concentration initiale totale de l'enzyme

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} \qquad K'_s = \frac{k_{-2}}{k_2}$$

2)- ou dans le cas d'un état stationnaire pour chacun des complexes actifs :

$$V_m = \frac{k_2 \, k_3 \, (E_t)}{k_2 + k_3}$$

(2)

$$K_m = \frac{k_3 \, (k_{-1} + k_2)}{k_1 (k_2 + k_3)}$$

Si l'une des étapes est limitante, les expressions se simplifient. Par exemple, lorsque l'étape limitante est l'acylation, k_2 est négligeable devant k_3 et

$$V_m = k_2 \, (E_t) \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

k_2 devient la constante de vitesse de catalyse. Si de plus, $k_2 \ll k_{-1}$,

K_m devient la constante d'affinité de l'enzyme pour son substrat.

La théorie de la catalyse bifonctionnelle suppose en outre que l'activité de l'enzyme est liée à l'état d'ionisation de deux groupements particuliers du centre actif. Le schéma réactionnel devient analogue à celui proposé par KRUPKA et LAIDLER (23) et ALBERTY et BLOOMFIELD (24) et K_m et V_m sont alors des fonctions du pH du milieu. Nous n'en avons pas tenu compte ici pour les deux raisons suivantes :

- Nous avons travaillé à pH constant ;

- De plus, on peut admettre que ces fonctions sont peu différentes de l'unité dans notre étude faite à pH = 7, car nous ne sommes pas très loin, du pH optimum.

Il convient d'envisager ces fonctions dans l'étude de l'inhibition en fonction du pH.

Le schéma simplifié que nous venons d'envisager n'est valable qu'aux faibles concentrations de substrat. En effet, la trypsine est activée aux fortes concentrations de substrat, par la fixation d'une deuxième molécule de substrat sur l'enzyme. Ce phénomène, analogue sur certains points à celui de l'allostérie définie par MONOD, CHANGEUX et JACOB (5), se retrouve pour des substrats spécifiques simples (TSAME, TSLME, BAEE) (+), et pour les Lactoglobulines A et B (12,25).

I_2) Théorie de l'inhibition réversible des réactions enzymatiques.

Toutes les inhibitions sont le résultat d'une interaction de l'inhibiteur avec un des composants du système :

1) réaction avec l'enzyme,

2) réaction avec le ou les complexes Enzyme-Substrat,

3) réaction avec le substrat,

4) réaction avec le milieu.

I_{21}) Types 1 et 2. Réaction avec l'enzyme ou les complexes ES d'une molécule d'inhibiteur.

En présence d'un inhibiteur agissant sur E ou ES, le schéma le plus général serait le suivant :

$$\begin{array}{ccccccc} E & \rightleftharpoons & ES & \rightleftharpoons & ES' & \rightleftharpoons & E + P \\ \uparrow\downarrow & & \uparrow\downarrow & & \uparrow\downarrow & & \uparrow\downarrow \\ EI & \rightleftharpoons & EIS & \rightleftharpoons & EIS' & \rightleftharpoons & EI + P \end{array}$$

(+) TSAME = Para-Toluène-Sulfonyl-L-Arginine-Méthyl-Ester,
TSLME = Para-Toluène-Sulfonyl-L-Lysine-Méthyl-Ester,
BAEE = Benzoyl-L-Arginine-Ethyl-Ester.

I_{211}) <u>On envisage un état d'équilibre pour chaque complexe Enzyme-Substrat</u>.

Explicitons les constantes d'équilibre

$$\begin{tikzcd}
E \arrow[r, shift left, "K_s"] \arrow[d, shift left] & ES \arrow[l, shift left] \arrow[r, shift left, "K'_s"] \arrow[d, shift left, "\alpha K_i"] & ES' \arrow[l, shift left] \arrow[r, "k"] \arrow[d, shift left, "\alpha K_i"] & E + P \arrow[d, shift left] \\
EI \arrow[u, shift left, "K_i"] \arrow[r, shift left, "\alpha K_s"] & EIS \arrow[u, shift left] \arrow[l, shift left] \arrow[r, shift left, "\alpha K'_s"] & EIS' \arrow[u, shift left] \arrow[l, shift left] \arrow[r, "\beta k"] & EI + P \arrow[u, shift left]
\end{tikzcd}$$

$K_i = \dfrac{(E)(I)}{(EI)}$; α et β sont les coefficients d'interaction qui représentent les changements dans les constantes de dissociation ou de vitesse de décomposition du complexe, induits par l'inhibiteur. Nous avons introduit les mêmes simplifications que précédemment, à savoir que la décomposition des complexes Acyl-Enzyme est irréversible et instantanée et ne peut, en aucun cas, limiter la vitesse.

<u>Mode de calcul</u>.

(Nous supposons $(E_t) \lll (S)$ et $(I) \ggg (S)$)

- On écrit l'équation régissant la vitesse :

$$v = k\ (ES') \text{ et } \beta k\ (EIS')$$

- on exprime E_t :

$$E_t = E + ES + ES' + EI + EIS + EIS'$$

- on écrit les différents équilibres :

$$E + S \overset{K_s}{\rightleftharpoons} ES \qquad K_s = \frac{(E)\ (S)}{(ES)} \qquad \text{etc ...}$$

- on résoud par rapport à ES' ; on obtient :

$$v = \frac{V_m S (\alpha K_i + \beta I)}{S (\alpha K_i + I) + K_m \alpha (K_i + I)}$$

- nous rappelons que :

$$V_m = \frac{k E_t}{1 + K'_s} \qquad K_m = \frac{K_s K'_s}{1 + K'_s}$$

Ce calcul se généraliserait aisément pour n substances se liant à l'enzyme.

Les différents types d'inhibition sont alors caractérisés par les différentes valeurs de α et β .

a) Inhibition complètement compétitive.

L'inhibiteur empêche complètement la liaison du substrat et de l'enzyme.

$$v = \frac{V_m (S)}{S + K_m (1 + I/K_i)}$$

Seule la constante de MICHAELIS apparente K_m est modifiée.

Inhibition partiellement compétitive $\infty > \alpha > 1$; $\beta = 1$

L'inhibiteur n'empêche que partiellement la fixation du substrat, mais n'affecte pas la vitesse de décomposition du complexe. Ici aussi, seul K_m est modifié, mais son expression n'est plus la même.

$$v = \frac{V_m S}{S + K_m \dfrac{\alpha(K_i + I)}{\alpha K_i + I}}$$

b) <u>Inhibition entièrement non compétitive</u> - $\alpha = 1$; $\beta = 0$

L'inhibiteur n'intervient pas dans la liaison E-S, mais empêche la décomposition du complexe actif.

$$v = \frac{V_m}{(1 + I/K_i)} \quad \frac{S}{S + K_m}$$

Seul V_m est modifié. De même que précédemment dans l'inhibition partiellement non compétitive ($\alpha = 1$; $0 < \beta < 1$), seul V_m est modifié et son expression plus complexe renferme β.

$$v = \frac{V_m S (K_i + \beta I)}{(S + K_m)(K_i + I)}$$

c) <u>Inhibition mixte et inhibition "uncompetitive"</u>.

Inhibition mixte $0 < \alpha < 1$; $\beta = 0$

L'affinité de l'enzyme pour le substrat est réduite par l'inhibiteur et la décomposition de EIS est empêchée.

$$v = \frac{V_m \alpha K_i}{I + \alpha K_i} \cdot \frac{S}{S + K_m \dfrac{\alpha (K_i + I)}{I + \alpha K_i}}$$

V_m et K_m sont tous deux modifiés.

Inhibition "uncompetitive" ou par blocage du complexe intermédiaire $\alpha = 0$; $\beta = 0$.

Cette forme d'inhibition peut être considérée comme une forme spéciale d'inhibition mixte, c'est pourquoi nous la traitons ici. Pourtant il faut bien noter que l'inhibition ne porte <u>que</u> sur ES.

Nous ne pouvons plus partir de l'expression générale de v ; il faut refaire le calcul :

$$K'_i = \frac{(ES)\ (I)}{(EIS)} = \frac{(ES')\ \ (I)}{(EIS')}$$

$$v = \frac{V_m}{1 + I/K_i} \cdot \frac{S}{S + K_m \dfrac{1}{1 + I/K_i}}$$

Ici, V_m et K_m sont modifiés par la même expression, différente de celles qui modifiaient ces constantes dans l'inhibition mixte.

I_{2I2}) <u>On envisage un état stationnaire pour chaque complexe Enzyme-Substrat.</u>

Reprenons le schéma :

$$\begin{tikzcd}
E \arrow[r, shift right, "k_1"'] & ES \arrow[l, shift right, "k_{-1}"] \arrow[r, shift right, "K_2"'] & ES' \arrow[l, shift right, "k_{-2}"] \arrow[r, "k_3"] & E + P \\
EI \arrow[u, shift left, "K_i"] \arrow[r, shift right, "k''_1"'] & EIS \arrow[u, shift left, "\alpha K_i"] \arrow[l, shift right, "k''_{-1}"] \arrow[r, shift right, "k''_2"'] & EIS' \arrow[u, shift left, "\alpha K_i"] \arrow[l, shift right, "k''_{-2}"] \arrow[r, "\beta k_3"'] & EI + P \arrow[u, shift left]
\end{tikzcd}$$

Verticalement, nous supposerons qu'il s'établit rapidement un équilibre, alors qu'horizontalement nous supposerons un état stationnaire pour chaque complexe et nous exprimerons les

constantes de vitesse. En effet, dès que le schéma se complique, il devient impossible d'exprimer la vitesse en supposant que toutes les réactions sont dans un état stationnaire.

Mode de calcul (+)

Reprenons l'hypothèse simplificatrice précédente :

$$k_{-2} = k''_{-2} = 0$$

Nous poserons $k''_2 = \beta k_2$; $k''_3 = \beta k_3$

- On définit de nouvelles variables :

$$x = E + EI = EI \quad (1 + K_i/I)$$

$$y_1 = ES + EIS = EIS \quad (1 + \alpha K_i/I)$$

$$y_2 = ES' + EIS' = EIS' \quad (1 + \alpha K_i/I)$$

- On exprime les vitesses nettes d'état stationnaire pour toutes les étapes successives :

$$-\frac{dS}{dt} = v_1 = (k_1 E + k''_1 EI)\, S - (k_{-1}\, ES + k''_{-1} EIS) = \overline{k}_1\, Sx - \overline{k}_{-1}\, y_1$$

(1) $$v_2 = k_2\, ES + k''_2\, EIS = \overline{k}_2\, y_1$$

$$\frac{dP}{dt} = v_3 = k_3\, ES' + \beta k_3\, EIS' = \overline{k}_3\, y_2$$

D'autre part :

(2) $$E_t = x + y_1 + y_2$$

L'hypothèse de l'état stationnaire s'exprime par :

(3) $$v_1 = v_2 = v_3 = v$$

(+) Ce mode de calcul se généralise pour n complexes intermédiaires (24) (26)

On écrit l'expression de la vitesse d'apparition du complexe ES' :

$$\frac{d\,(ES')}{dt} = 0 \quad \text{en état stationnaire}$$

En résolvant de proche en proche (1), (2) et (3), on obtient d'abord l'expression de la concentration de ES', puis celle de v, et puisque :

$$k_1\, K_i\, k''_{-1} = \alpha\, K_i\, k_{-1}\, k''_1$$

finalement :

$$v = \frac{V_{st}\ S}{S + K_{st}} = \frac{\dfrac{\bar{k}_2\, \bar{k}_3\, E_t\, S}{\bar{k}_2 + \bar{k}_3}}{S + \dfrac{\bar{k}_3\,(\bar{k}_2 + \bar{k}_{-1})}{\bar{k}_1\,(\bar{k}_2 + \bar{k}_3)}} \quad \text{avec}$$

$$\bar{k}_1 = \frac{k_1 + k''_1\, I/K_i}{1 + I/K_i} \qquad \bar{k}_{-1} = \frac{k_{-1} + k''_{-1}\, I/\alpha K_i}{1 + I/\alpha K_i}$$

$$\bar{k}_2 = \frac{k_2 + k''_2\, I/\alpha K_i}{1 + I/\alpha K_i} \qquad \bar{k}_3 = \frac{k_3\,(\alpha K_i + \beta I)}{I + \alpha K_i}$$

ce qui nous donne :

$$V_{st} = \frac{\dfrac{k_2 + k''_2\, I/\alpha K_i}{1 + I/\alpha K_i} \cdot \dfrac{k_3\,(\beta I + \alpha K_i)}{I + \alpha K_i}}{\dfrac{k_2 + k''_2\, I/K_i\alpha}{1 + I/\alpha K_i} + k_3\, \dfrac{\beta I + \alpha K_i}{I + \alpha K_i}}\, E_t \quad \text{et}$$

$$K_{st} = \frac{\dfrac{k_3\,(\beta I + \alpha K_i)}{I + \alpha K_i}\left(\dfrac{k_2 + k''_2\, I/\alpha K_i}{1 + I/\alpha K_i} + \dfrac{k''_{-1}\, I/\alpha K_i + k_{-1}}{1 + I/\alpha K_i}\right)}{\dfrac{k_1 + k''_1\, I/K_i}{1 + I/K_i}\left(\dfrac{k_2 + k''_2\, I/\alpha K_i}{1 + I/\alpha K_i} + \dfrac{k_3\,(I\beta + \alpha K_i)}{I + \alpha K_i}\right)}$$

Nous allons envisager comme précédemment les différents types d'inhibition suivant les différentes valeurs de α et de β. Ces différentes valeurs possibles de α et de β introduisent des simplifications qui suppriment certains intermédiaires ; mais les schémas correspondants rentrent dans le cas général.

a) <u>Inhibition complètement compétitive</u> : $\alpha = \infty$

Le schéma est, dans ce cas, particulièrement simple.

$$\bar{k}_1 = \frac{k_1}{1 + I/K_i} \; ; \; \bar{k}_{-1} = k_{-1} \; ; \; \bar{k}_2 = k_2 \; ; \; \bar{k}_3 = k_3$$

$$V_{st} = \frac{k_2\, k_3}{k_2 + k_3}\, E_t = V_m \; ; \; K_{st} = \frac{k_3\,(k_{-1} + k_2)}{k_1\,(k_2 + k_3)}\,(1 + I/K_i) = K_m\,(1 + I/K_i)$$

Seul, K_{st} est modifié.

L'inhibition partiellement compétitive ($\infty > \alpha > 1$; $\beta = 1$) devient beaucoup plus complexe.

$$V_{st} = \frac{k_3\, E_t \left(\dfrac{k_2 + k''_2\, I/\alpha K_i}{1 + I/\alpha K_i}\right)}{k_3 + \dfrac{k_2 + k''_2\, I/\alpha K_i}{1 + I/\alpha K_i}} = \frac{k_2\, k_3\, E_t}{k_2 + k_3}$$

$$K_{st} = \frac{k_3 \left(k_2 + \frac{k_{-1} + k''_{-1}\, I/\alpha K_i}{1 + I/\alpha K_i}\right)}{(k_2+k_3)\left(\frac{k_1 + k''_1\, I/K_i}{1 + I/K_i}\right)} = \frac{k_3}{(k_2+k_3)} \left(\frac{\alpha(K_i + I)}{(\alpha K_i + I)\, k_1}\right) \left(k_{-1} + \frac{k_2 k_1 (1 + I/\alpha K_i)}{k_1 + k''_1 I/K_i}\right)$$

K_{st} seul encore, est modifié, mais comme précédemment pas de la même façon.

b) <u>Inhibition complètement non compétitive</u> : $\alpha = 1$; $\beta = 0$.

$$V_{st} = \frac{k_2\, k_3\, E_t}{(k_2 + k_3)\,(1 + I/K_i)} \; ; \; K_{st} = \frac{k_3}{(k_2 + k_3)\, k_1} \left(k_{-1} + \frac{k_2}{1 + I/K_i}\right)$$

K_{st} et V_{st} sont modifiés.

On peut donc dire avec DIXON (27) que "pour de tels systèmes, il ne peut y avoir de pur effet non compétitif puisque n'importe quel effet sur V_m se traduira sur K_m". Une pure inhibition non compétitive est donc impossible dans les systèmes en état stationnaire. On obtiendrait cependant la même modification que dans le cas de l'équilibre en supprimant la possibilité de formation du complexe EIS à partir de EI, mais ceci représente une simplification extrême qui ne peut être appliquée d'emblée à tous les systèmes.

Pour l'inhibition partiellement non compétitive, nous avons : $\alpha = 1$; $0 < \beta < 1$.

$$V_{st} = \frac{k_2\, k_3 \left(\frac{\beta I + K_i}{I + K_i}\right)}{k_2 + k_3} E_t \; ; \; K_{st} = \frac{k_3 \left(k_{-1} + k_2 \left(\frac{\beta I + K_i}{I + K_i}\right)\right)}{(k_2 + k_3)\, k_1}$$

c) <u>Inhibition mixte et "uncompetitive"</u> : $\infty > \alpha > 1$; $\beta = 0$.

$$V_{st} = \frac{k_2\, k_3}{(k_2 + k_3)\,(1 + I/\alpha K_i)} E_t$$

$$K_{st} = \frac{k_3}{(k_2 + k_3)} \left(\frac{\alpha(I + K_i)}{(\alpha K_i + I)k_1}\right) \left(k_{-1} + \frac{k_2\, k_1}{k_1 + k''_1\, I/K_i}\right)$$

L'inhibition par blocage du complexe intermédiaire ou "uncompetitive" donne un schéma très simple pour lequel il faut refaire le calcul.

Nous obtenons :

$$V_{st} = \frac{k_2\, k_3\, E_t}{(k_2 + k_3)\,(1 + I/K'_i)} \; ; \; K_{st} = \frac{k_3\,(k_{-1} + k_2)}{k_1\,(k_2 + k_3)\,(1 + I/K'_i)}$$

K'_i a la même définition que précédemment.

I_{22}) <u>Type 3. Réaction d'une molécule d'inhibiteur avec le substrat.</u>

Nous devons envisager deux sortes d'effets :

- ce que les anglo-saxons appellent "depletion mutuelle" ;
- la liaison de l'inhibiteur directement avec S et non plus avec E.

Il est souvent difficile de distinguer les types d'inhibition produits dans ce cas, de ceux où l'inhibiteur se fixe sur l'enzyme, si l' on utilise l'analyse cinétique habituelle.

I_{221}) Nous avons supposé jusqu'à présent que les concentrations de S et I étaient toutes deux suffisamment grandes devant celles de l'enzyme, pour que nous puissions assimiler la concentration de S ou I libre à leur concentration totale. Si cette hypothèse n'est plus vérifiée, il faut réécrire les formules en introduisant la vraie valeur de ces concentrations. Cette "déplétion mutuelle" peut être due à de nombreuses causes : soit que la concentration du corps avec lequel se lie l'inhibiteur (E ou S) ne soit pas petite devant celle de l'inhibiteur, soit que l'affinité de l'inhibiteur pour ce corps soit si grande que la concentration de E ou S libre soit réduite par formation du complexe avec l'inhibiteur, bien que leur concentration puisse être faible.

STRAUSS et GOLDSTEIN (28) qui ont étudié ce problème dans le cas de la Cholinestérase, ont fait observer que les grandeurs caractéristiques ne sont plus les concentrations mais les "concentrations réduites" c'est-à-dire le rapport des concentrations aux constantes d'affinité des complexes correspondants.

Nous sommes toujours restés au cours de nos expériences dans des conditions où la concentration de l'inhibiteur était très grande par rapport à la fois au Substrat et à l'Enzyme, la seule possibilité de "déplétion mutuelle" correspond donc au cas où l'affinité de I pour S serait telle que la concentration de S_{libre} serait très réduite.

On remplace S_t par S = concentration en substrat libre

$$S + I \rightleftharpoons SI \qquad K_{si} = \frac{(S)\ (I)}{(SI)}$$

$$S_t = S + SI \qquad I_t = I + SI$$

On obtient

$$S^2 + (I_t - S_t + K_{si})\ (S) - S_t\ K_{si} = 0$$

soit :

$$S = I/2 \sqrt{(I_t - S_t + K_{si})^2 - 4S_t K_{si}} - I/2\ (I_t - S_t + K_{si})$$

On porte cette valeur dans l'expression de la vitesse et on la compare avec la valeur en absence d'inhibiteur. L'effet ressemble en première analyse à <u>l'inhibition compétitive</u>.

Si I_t reste très grand devant S_t, I reste peu différent de I_t et

$$S_t = S\ (1 + I/K_{si}) \text{ dans ce cas } v = \frac{V_m\ S}{S + K_m\ (1 + I/K_{si})}$$

I_{222}) - <u>Inhibition due à la formation du complexe SI</u>.

a) Si l'inhibiteur se lie au substrat libre ou combiné à l'enzyme sans que les complexes ainsi formés soient capables de redonner la réaction, le schéma est le suivant :

$$\begin{array}{ccccccc} E + S & \rightleftharpoons & ES & \longrightarrow & ES' & \longrightarrow & E + P \\ K_i \Updownarrow & & \Updownarrow K_i & & \Updownarrow K_i & & \\ SI & & ESI & & ES'I & & \end{array}$$

Si I reste $\gg$ S

Nous retrouvons l'expression de <u>l'inhibition non compétitive</u>.

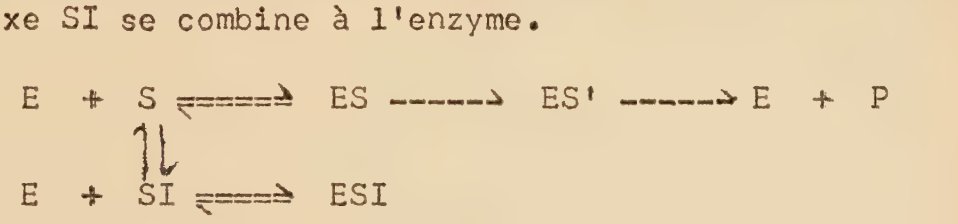
Dans le cas de l'équilibre :

$$v = \frac{V_m}{(1 + I/K_i)} \quad \frac{S}{S + K_m} = \frac{\dfrac{k\,E_t}{1 + K'_s} \quad S}{(1 + I/K_i)\left(S + \dfrac{K_s\,K'_s}{1 + K'_s}\right)}$$

Dans le cas de l'état stationnaire : on a une expression analogue

$$v = \frac{\dfrac{k_2\,k_3\,E_t}{k_2 + k_3} \quad S}{(1 + I/K_i)\left(S + \dfrac{k_3\,(k_{-1} + k_2)}{k_1\,(k_2 + k_3)}\right)}$$

b) Nous venons d'envisager une forme d'inhibition "totale" selon REINER, c'est-à-dire dans laquelle la réaction ne peut se faire à aucune étape dès que l'inhibiteur est lié à l'un quelconque des composés du système. Il nous reste à envisager le cas où le complexe SI se combine à l'enzyme.



On obtient une inhibition de la forme complètement compétitive. En employant la représentation $I_t = f\ (i/1-i)$; $i = 1 - v_i/v$ avec v = vitesse en l'absence d'inhibiteur, v_i en présence de l'inhibiteur, on obtient dans ce cas une droite passant par l'origine.

Nous avons résumé les différentes formes d'inhibition par réaction avec E, ES ou S dans un tableau (I). Nous avons jusqu'à présent envisagé le problème dans sa plus grande généralité, rappelons les simplifications possibles :

1) admettre une étape limitante dans le schéma de la réaction non inhibée ;

2) supposer qu'il existe un pseudo-équilibre entre les différents complexes et leurs composants, ce que nous avons appelé cas de l'équilibre ;

3) n'envisager que l'inhibition "totale" de REINER. La réaction ne peut se faire lorsque l'inhibiteur est lié à l'un quelconque des composés du système. Cette dernière hypothèse introduit une très grande simplification qui permet de retrouver les mêmes expressions de la vitesse de réaction quel que soit le mode de calcul, et que l'inhibiteur se fixe sur l'Enzyme ou sur le Substrat.

I_{23}) - <u>Plusieurs molécules d'inhibiteur se lient à l'Enzyme</u>.

Plusieurs cas peuvent se présenter, le seul possible à explorer par les procédés habituels dans la théorie classique de MICHAELIS-HALDANE est celui où chaque centre actif lie plus d'une molécule. Nous n'envisagerons que deux molécules liées par molécule d'enzyme car, la liaison de trois molécules ou plus est extrêmement rare. Dans le cas de <u>l'inhibition complètement non compétitive</u> ($\alpha = 1$; $\beta = 0$) on obtient :

Type d'inhibition	REACTION avec E		REACTION avec S	
	Equilibre et état stationnaire		Equilibre et état stationnaire	
A) - Totale (°)	K_m apparent	V_m apparent	K_m apparent	V_m apparent
COMPETITIVE	$K_m\ (1 + I/K_i)$	V_m	$K_m/(1 + I/K_i)$	V_m
NON COMPETITIVE .	K_m	$V_m/(1 + I/K_i)$	K_m	$V_m/(1 + I/K_i)$
"UNCOMPETITIVE" .	$K_m/(1 + I/K_i)$	$V_m/(1 + I/K_i)$	$K_m/(1 + I/K_i)$	$V_m/(1 + I/K_i)$
	REACTION avec E			
B) - Partielle	Equilibre		Etat stationnaire	
Partiellement COMPETITIVE	$Km\ \frac{\alpha\ (K_i + I)}{\alpha\ K_i + I}$	V_m	K_m modifié	V_m
NON COMPETITIVE .	K_m	$V_m/(1 + I/K_i)$	K_m modifié	$V_m/(1 + I/K_i)$
Partiellement NON COMPETITIVE	K_m	$V_m\ \frac{K_i + \beta I}{K_i + I}$	K_m modifié	V_m modifié
MIXTE	$K_m\ \frac{\alpha\ (K_i + I)}{I + \alpha K_i}$	$V_m\ \frac{\alpha K_i}{I + \alpha K_i}$	K_m modifié	$V_m/(1 + I/\alpha K_i)$

(°) Selon REINER

- pour le pseudo-équilibre

$$
\begin{tikzcd}
E \arrow[r, leftrightharpoons, "K_s"] \arrow[d, leftrightharpoons, "K_i"'] & ES \arrow[r, leftrightharpoons, "K'_s"] \arrow[d, leftrightharpoons, "K_i"] & ES' \arrow[r, dashed, "k"] \arrow[d, leftrightharpoons, "K_i"] & E + P \\
EI \arrow[r, leftrightharpoons, "K_s"'] \arrow[d, leftrightharpoons, "\delta K_i"'] & EIS \arrow[r, leftrightharpoons, "K'_s"] \arrow[d, leftrightharpoons, "\delta K_i"] & EIS' \arrow[d, leftrightharpoons, "\delta K_i"] & \\
EI_2 \arrow[r, leftrightharpoons, "K_s"'] & EI_2S \arrow[r, leftrightharpoons, "K'_s"'] & EI_2S' &
\end{tikzcd}
$$

$$
\boxed{v = \frac{V_m \; S}{\left[S + K_m\right] \left(1 + I/K_i + (I/K_i)^2 \; 1/\delta\right)}}
$$

V_m et K_m ont les valeurs précédemment déterminées (p. 8)

- pour l'état stationnaire et l'inhibition "totale" de REINER :

$$
\begin{tikzcd}
E \arrow[r, leftrightharpoons, "k_1", "k_{-1}"'] \arrow[d, leftrightharpoons, "K_i"'] & ES \arrow[r, dashed, "k_2"] \arrow[d, leftrightharpoons, "K_i"] & ES' \arrow[r, dashed, "k_3"] \arrow[d, leftrightharpoons, "K_i"] & E + P \\
EI \arrow[d, leftrightharpoons, "\delta K_i"'] & EIS \arrow[d, leftrightharpoons, "\delta K_i"] & EIS' \arrow[d, leftrightharpoons, "\delta K_i"] & \\
EI_2 & EI_2S & EI_2S' &
\end{tikzcd}
$$

On obtient la même expression où V_m et K_m ont une autre signification (p.8).

δ exprime le changement d'affinité de l'inhibiteur dû au fait qu'une première molécule est liée. Plusieurs cas peuvent se présenter suivant les valeurs de δ

- $\delta = 1$ le facteur d'inhibition i devient :

$$i = \frac{I/K_i + (I/K_i)^2}{1 + I/K_i + (I/K_i)^2}$$

- δ est très petit, c'est-à-dire lorsque la deuxième molécule d'inhibiteur est liée plus fortement que la première. Nous sommes en présence d'un effet coopératif

$$i = \frac{(I^2)}{(I^2) + K_i^2\,\delta}$$

- δ est très grand, la deuxième molécule est liée beaucoup moins fortement que la première

$$i = \frac{I/K_i}{I/K_i + 1}$$

On retrouve l'équation habituelle de l'inhibition non compétitive dans le cas d'une molécule d'inhibiteur liée.

Dans l'inhibition non compétitive étudiée dans le cas de l'équilibre ou de l'inhibition "totale" de REINER, pour une molécule d'inhibiteur liée, la valeur de la concentration de l'inhibiteur pour une inhibition de 50 % est K_i. Ceci conduit à écrire :

$$(I)_{0,5} = K_i$$

Cependant, lorsque deux molécules d'inhibiteur se lient à l'Enzyme $(I)_{0,5}$ dépend de δ et devient :

$$(I)_{0,5} = K_i \frac{-\delta + \sqrt{\delta^2 + 4\delta}}{2}$$

I_{24} - Plusieurs molécules se lient au Substrat.

Nous n'envisagerons que le cas qui donne une inhibition du type non compétitif, et ceci dans l'hypothèse de l'état stationnaire pour une inhibition "totale".

$$\begin{array}{ccccccc}
E + S & \underset{k-1}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} & ES & \xrightarrow{k_2} & ES' & \xrightarrow{k_3} & E + P \\
\Big\updownarrow K_i & & \Big\updownarrow K_i & & \Big\updownarrow K_i & & \\
SI & & ESI & & ES'I & & \\
\Big\updownarrow \delta K_i & & \Big\updownarrow \delta K_i & & \Big\updownarrow \delta K_i & & \\
SI_2 & & ESI_2 & & ES'I_2 & &
\end{array}$$

Lorsque I reste très grand devant S on obtient, en remplaçant S_t par S_1 avec

$$S_1 = \frac{S_t}{(1 + I/K_i + (I/K_i)^2\, 1/\delta)}$$

la même expression que lorsque l'inhibiteur se lie à l'Enzyme.

S_t = concentration totale de Substrat

S_1 = concentration de Substrat libre

$$K_i = \frac{(S)\ (I)}{(SI)} \qquad \delta K_i = \frac{(SI)\ (I)}{(SI_2)}$$

Nous venons d'envisager la fixation des deux molécules d'inhibiteur sur le même centre actif ; cette hypothèse est très peu probable.

Si plus rationnellement nous envisageons deux molécules fixées sur deux sites différents, nous devons abandonner les équations de la cinétique classique ou celles des réactions bimoléculaires et envisager celles des interactions moléculaires dans des molécules à fonctions multiples (1,6).

Nous obtenons l'expression suivante :

$$q\,\overline{y} = d\ln \sum_{o}^{q} K_i\ I^i \,/\, d\ln I$$

q = nombre de groupes capables de se fixer avec l'inhibiteur I

$\overline{Y}$ = "Saturation fractionnelle" de la macro-molécule M par I

K_i = Constantes apparentes des différents équilibres

$$M + iI = M\,I^i$$

Lorsque les sites de fixation de la macromolécule sont identiques et indépendants, la représentation de $\overline{Y}$ en fonction de (I) donne une hyperbole équilatère.

$$\frac{\overline{Y}}{1 - \overline{Y}} = \text{Constante } I$$

Dans le cas général on obtient une sigmoïde. La représentation de HILL (29,1).

$$\text{In}\ \frac{\overline{Y}}{1-\overline{Y}} = f\left[\ln\ (I)\right]$$

donne très largement une droite de part et d'autre du milieu de la courbe. On peut alors remplacer l'expression de $\bar{Y}$ par une expression approchée:

$$\frac{d}{d \ln I} \ln \left(\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} \right) = n$$

si n est indépendant de I

$$\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = \text{constante } I^n$$

On peut montrer de façon rigoureuse et générale, indépendante de l'approximation précédente que n défini comme la pente de la courbe $\bar{Y} = f(\ln I)$ pour $\bar{Y} = \frac{1}{2}$ est donné par

$$n = \left[\sum_{i=o}^{q} (4 i^2 - q^2) K_i I^i_{1/2} \right] \Big/ \left[q \sum_{i=o}^{q} K_i I^i_{1/2} \right]$$

Lorsque n est plus grand que 1, bien que ceci n'est jamais été démontré rigoureusement l'expérience prouve qu'il y a des interactions de stabilisation au moins entre certains groupes.

Dans le cas où la macromolécule possède deux sites avec des constantes microscopiques d'association

k_i pour la première molécule, et

γk_i pour la deuxième

$$\bar{Y} = \frac{2 (k_i I + \gamma k_i^2 I^2)}{1 + 2 k_i I + \gamma k_i^2 I^2}$$

Dans l'hypothèse où l'inhibition de la protéolyse provient de la liaison de l'inhibiteur avec le substrat, il est raisonnable de penser que la vitesse de la réaction est directement liée au degré de saturation du substrat par l'inhibiteur (dans le cas de l'inhibition totale évidemment).

La représentation de $\ln \frac{v_i}{v - v_i}$

en fonction de $\ln I$ doit donc nous donner une droite de pente n.

De l'expression de n, et de celle de Y pour $I = I_{0,5}$ nous pouvons alors tirer γ et k_i.

I_3 - Réaction de l'inhibiteur avec le milieu.

La diminution de la vitesse de la réaction peut ne pas être dûe à une véritable liaison de l'inhibiteur avec l'enzyme ou le substrat, mais à une modification du milieu. L'addition de l'inhibiteur peut, en effet, entraîner une variation de la viscosité, de la force ionique, de la constante diélectrique, de la structure de l'eau renforçant ou modifiant les interactions hydrophobes comme cela se produit dans le cas de l'action des sels sur la lactoglobuline (30).

.
. .

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL.

Substrats

1) β-Lactoglobuline A native.

La β-Lactoglobuline a été préparée au laboratoire par la méthode de PALMER (31) modifiée par OGSTON et CECIL (32).

La protéine obtenue est recristallisée trois fois avant utilisation ; les deux dernières par dialyse contre l'eau bi-distillée (dans un appareil de quartz), et conservée 10 à 15 jours dans les eaux-mères de cristallisation, ou redissoute dans le sulfate d'ammonium à 50 %. Les solutions de protéine dans le chlorure de sodium 0,1 M sont faites et utilisées le jour même.

2) β-Lactoglobuline A dénaturée par la chaleur.

Nous avons utilisé la forme "f" de BRIGGS et HULL (33). La Lactoglobuline à la concentration de 5 à 10 mg/ml est mise en ampoule scellée, chauffée 10 minutes au bain-marie à 100°C, puis refroidie immédiatement dans un bain de glace ; cette opération est suivie d'un chauffage de 4 heures à 60°C. La protéine dénaturée est ajustée à la concentration saline 0,1 M en dialysant jusqu'à équilibre contre la solution de sel.

3) TSAME - Toluène-Sulfonyl-L-Arginine-Méthyl-Ester-chlorhydrate est un produit "Mann Research Laboratories"

Enzymes

1) Trypsine.

Nous avons utilisé le produit Worthington en solution dans HCL N/100, libéré par dialyse du sulfate de Magnésium présent dans l'échantillon commercial. Cette solution se conserve 8 à 10 jours à 4°C sans perte d'activité appréciable.

2) α-Chymotrypsine Worthington en solution dans HCL N/100. La solution mère préparée à la concentration d'environ 27 mg/ml est gardée à 4°C pendant 5 à 6 jours et diluée convenablement pour chaque expérience.

Les concentrations de protéine sont mesurées par leur densité optique à 280 mμ en prenant pour coefficient d'extinction :

$$\mathcal{E}\begin{cases} 1 \text{ mg/ml} \\ 1 \text{ cm} \end{cases} \begin{cases} 0{,}96 \text{ pour la } \beta\text{-Lactoglobuline A} \\ 1{,}58 \text{ pour la Trypsine} \\ 2{,}00 \text{ pour l'}\alpha\text{-Chymotrypsine} \end{cases}$$

Inhibiteurs

1) D (+) Saccharose. Produit Merck N° 7652 ou 7653, utilisé en solution dans ClNa 0,1 M et dont les impuretés sont :

Acide sulfureux	inférieur à	0,0075 %
Chlore	" "	0,0025 %
Sulfate	" "	0,005 %
Sels de métaux lourds exprimés en cuivre	" "	0,005 %
Plomb	" "	0,0002 %
Arsenic	" "	0,0002 %

2) Alpha D (+) Glucose, Produit Anhydre Mann Research Laboratories utilisé en solution dans ClNa 0,1 M.

3) D (+) Maltose. Produit LIGHT, utilisé en solution ClNa 0,1 M.

∴

METHODES.

Les mesures de la protéolyse ont été faites par la méthode potentiométrique continue à pH constant, en milieu non tamponné.

Cette méthode consiste à titrer les groupes aminés libérés par rupture des liaisons peptidiques, par la soude décinormale en maintenant le pH à 7.

Une partie seulement de ces groupes est sous forme cationique et on titre les protons apparus :

$$\underset{1-\alpha}{NH_3^+} \rightleftharpoons \underset{\alpha}{NH_2} + \underset{\alpha}{H^+}$$

La pente de la courbe : nombre de protons = f (temps) qui est linéaire au début de la réaction, donne la vitesse initiale. La durée pendant laquelle la vitesse d'hydrolyse est constante varie suivant les conditions de l'expérience : milieu salin, pH, concentration en enzyme et substrat, température. Pour pouvoir exprimer la vitesse en nombre de liaisons peptidiques rompues par unité de temps, il faut connaître la valeur de α.

Nous avons pris pour valeur de α à pH = 7 et 35°C ; 0,38 selon M. MONNOT (8) qui a retrouvé pour les lactoglobulines A et B, la même valeur que celle déjà déterminée par J. YON (34) pour le mélange des Lactoglobulines.

.
. .

TECHNIQUE.

Nous avons utilisé un pH-mètre Vibron (E.I.L.) de très grande sensibilité (10^{-3} unité pH).

10 ml de solution de protéine avec ou sans inhibiteur en solution dans ClNa 0,1 M sont introduits dans un récipient cylindrique maintenu, grâce à un thermostat "Thermomix" Braun, à une température fixe à 10^{-1} degré C près, et agitée à l'aide d'un agitateur magnétique. Lorsque la température désirée est obtenue, on ajuste le pH à 7 avec la soude N/10 à l'aide d'une microseringue "Agla" dont l'extrémité plonge avec les électrodes dans le récipient.

Au temps t = 0, on ajoute avec une micropipette à striction 50 à 100 µl de Trypsine conservée dans la glace fondante, à une concentration qui donne encore une relation linéaire entre la vitesse et la concentration en enzyme.

Très rapidement on ajoute de la soude pour neutraliser la Trypsine d'une part et les protons apparus par hydrolyse, en léger excès de façon à ce que le pH soit supérieur à 7 d'environ 1/100ème d'unité pH. On note chaque fois le temps de passage à pH 7.

Lorsqu'on fait des courbes de titrage, on opère sous atmosphère d'azote pour éviter la dissolution du gaz carbonique de l'air.

.
. .

CHAPITRE III

RESULTATS

III_1 - Mise en évidence d'un phénomène d'inhibition à pH = 7, 35°C, μ = 0,1, de la protéolyse trypsique de la β-Lactoglobuline A par le saccharose.

Nous avons observé que des concentrations relativement fortes de saccharose inhibent la protéolyse trypsique de la β-Lactoglobuline A jusqu'à annuler la vitesse initiale de cette réaction (Fig.I)

III_2 - Cette inhibition est bien dûe au Saccharose.

L'inhibition apparaît pour une concentration en Saccharose 0,2 M et devient totale pour 1,5 M. Eliminons tout d'abord toutes les causes possibles de diminution de la vitesse, autres que la présence du Saccharose en tant que tel.

Impuretés du Saccharose

Nous avons employé des Saccharoses de trois sources différentes (Billaut ; Merck n° 7652 et 7653, qualité pour ampoules), avec des résultats identiques et parfaitement reproductibles.

Bien qu'il soit peu vraisemblable que le taux des impuretés (cf. p. 32) soit exactement le même dans les trois produits, nous en avons vérifié l'influence. Pour des concentrations en Saccharose variant de 0,2 à 1,5 M, les concentrations des anions présents dans le milieu, restent 10 à 1000 fois plus petites que celles qui, dans les mêmes conditions de pH et

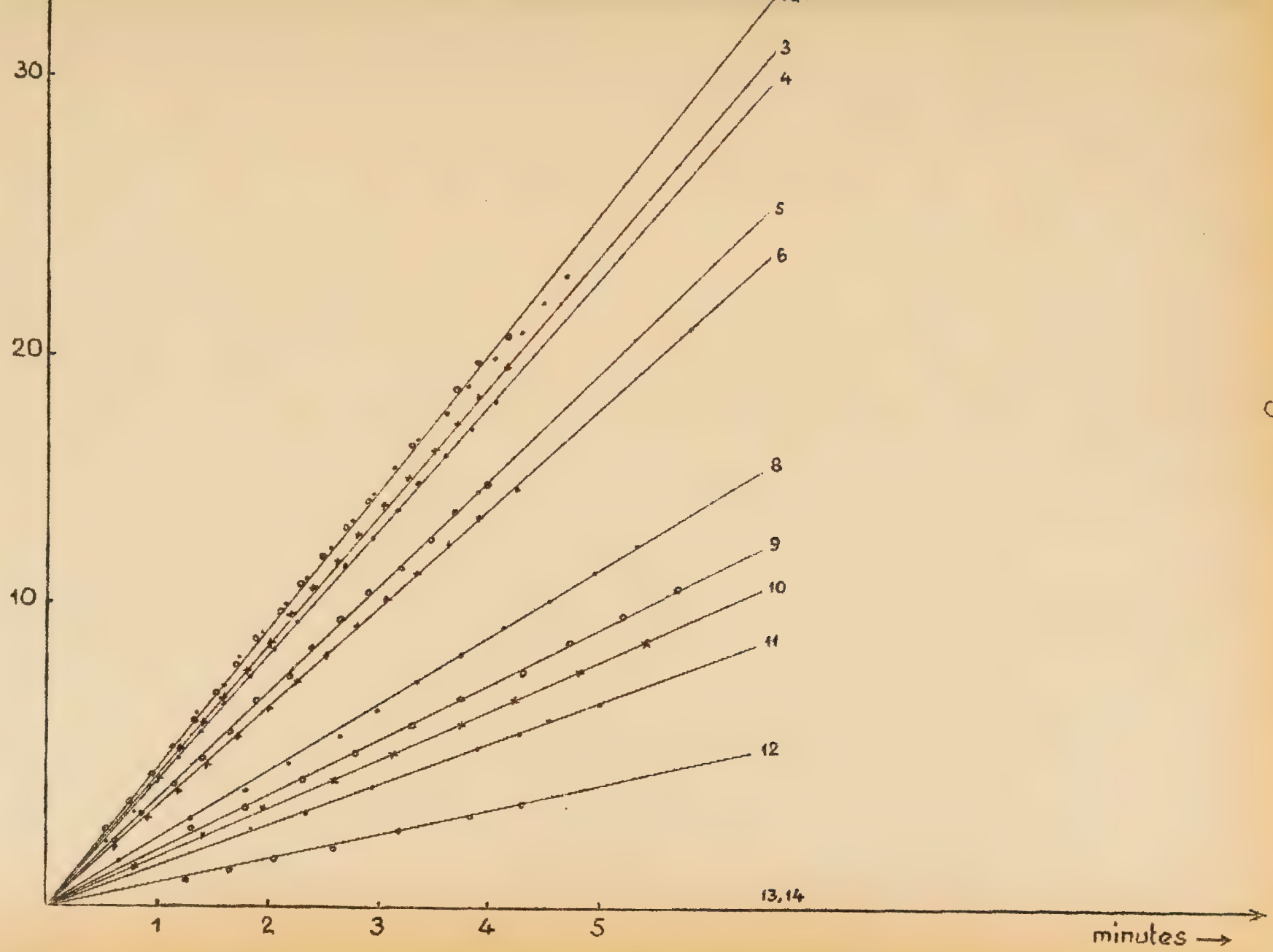


Fig. 1

Légende de la Figure 1

1-	β-Lactoglobuline seule 6,04 mg/ml			
2-	"	+	Saccharose	0,2 M
3-	"	+	"	0,25 M
4-	"	+	"	0,30 M
5-	"	+	"	0,45 M
6-	"	+	"	0,50 M
8-	"	+	"	0,70 M
9-	"	+	"	0,80 M
10-	"	+	"	0,90 M
11-	"	+	"	1,00 M
12-	"	+	"	1,20 M
13-	"	+	"	1,50 M
14-	"	+	"	1,74 M

de température, sont sans influence sur la vitesse (8). Par contre, J. YON a montré que le Cuivre à une concentration de $3,5.10^{-5}$ M entraîne une activation de 50 % de la vitesse de protéolyse trypsique de la β-Lactoglobuline. Or, les concentrations des métaux lourds (tels que le Cuivre), dans le Saccharose 0,2 à 1,5 M sont, au plus, entre 5,4 et $40,4.10^{-5}$M. Nous avons donc effectué des hydrolyses en présence et en absence de Versène qui est sans influence sur la protéolyse trypsique de la Lactoglobuline seule.

Nous avons résumé dans le Tableau II nos résultats. Pour des taux d'inhibition correspondant à ceux de la Fig. I, la présence de Versène augmente celle-ci d'environ 10 %, c'est-à-dire que la différence reste dans les limites des erreurs d'expérience. Cette différence pourrait correspondre à une légère activation dûe aux métaux lourds.

Viscosité

a) Macroscopique. Indépendamment du fait que les réactions de protéolyse ne sont pas annulées par l'emploi d'un milieu aussi visqueux qu'un gel d'agar-agar, dans lequel l'enzyme est appelé à diffuser (35), alors que nous observons avec des solutions de Saccharose une inhibition totale, nous n'avons jamais pu mettre en évidence d'inhibition en présence d'amidon, même à forte concentration.

Nos résultats montrent que les variations de vitesse sont en général inférieures aux limites de l'erreur expérimentale admise. Elles correspondent d'ailleurs à la dérive de l'appareil et s'annulent lorsqu'on fait la correction. Elles sont directement en rapport avec la quantité d'ions adsorbés sur l'amidon et disparaissent en présence de Versène.

- TABLEAU II -

Pourcentage de variation de la vitesse de protéolyse trypsique de la β Lactoglobuline A native en présence de Versène, pH = 7,00, 35°C.
Concentration en substrat (S) = 5,7 mg/ml. Concentration en enzyme (E) = 104 µg/ml.
Concentration en Versène = 36,4 µg/ml.

	Différences entre les vitesses des hydrolyses faites en présence et en absence de Versène.
β-Lactoglobuline A	0 %
" + Saccharose 0,5 M ...	- 14 %
" " 0,8 M ...	- 10 %
" " 1 M ...	- 4 %

J.Cl. LAPORTE (Thèse 3ème Cycle (36) a montré de même que la protéolyse trypsique du lait n'était pas modifiée par la présence d'amidon cru et de solutions d'amidon cuit, infiniment plus visqueuses que les solutions les plus concentrées utilisées dans ce travail.

b) Microscopique. Cependant, l'inversion de l'effet observé lorsqu'on opère avec des substrats différents (TSAME Lactoglobuline native et dénaturée) ne peut être attribuée à la viscosité du Saccharose qu'elle soit macroscopique ou microscopique.

Constante diélectrique

L'importance des interactions entre molécules dépend souvent de la constante diélectrique du milieu séparant et entourant ces molécules ; son rôle dans les interactions ioniques et dipolaires est évident. L'eau qui constitue la plus grande part des milieux étudiés a une constante diélectrique élevée qui réduit appréciablement les interactions ; si la constante diélectrique est abaissée, on doit s'attendre à ce que les interactions électrostatiques deviennent plus grandes, alors que les forces électrocinétiques (ou de London) ne sont pas affectées significativement. Evidemment, la connaissance de la valeur de la constante diélectrique microscopique pourrait seule rendre compte des vraies variations de la vitesse avec cette grandeur.

Cependant, J. YON a pu montrer l'influence de la constante diélectrique macroscopique sur la vitesse des réactions enzymatiques (37). Dans le cas de la Lactoglobuline hydrolysée par la Trypsine, la vitesse augmente quand la constante diélectrique diminue.

La valeur de la vitesse maximum triple lorsque la constante diélectrique passe de 80 à 63, à pH = 7.

Dans nos expériences ΔD, (la variation de constante diélectrique) reste $\leqslant 20$ pour des concentrations en Saccharose de 0 à 1,4 M, d'après les Tables Annuelles de Constantes et Données Numériques, publiées par GAUTHIER-VILLARS sous la direction de Ch. MARIE, 1930, p. 231.

Nous pouvons donc penser que, bien que la variation de constance diélectrique soit du même ordre de grandeur que celle des expériences de J. YON, le phénomène d'inhibition que nous observons ne peut, en toute rigueur, lui être attribué, puisque les expériences étant par ailleurs, en tous points identiques, la variation de constante diélectrique entraîne une forte activation alors que la présence de Saccharose conduit à une inhibition totale.

De plus, nous verrons plus loin que des variations de constante diélectrique doivent entraîner un déplacement des pK, lors du titrage des protéines, et que nous n'observons aucun déplacement au cours du titrage de la β-Lactoglobuline A dans la zone de pH où nous observons une inhibition. La molécule du sucre étant, par ailleurs, peu polaire, pourraît entraîner une inhibition sans rapport avec la constante diélectrique du milieu.

III_3- Etude cinétique

III_{31}) Modes de représentation graphique.

Parmi tous les modes de représentation graphique possibles, on peut en choisir 6. Ils ne sont pas équivalents et certains s'appliquent mieux que d'autres aux différentes formes d'inhibition.

La confrontation des courbes obtenues par les 6 méthodes permet de s'assurer plus sûrement de la valeur de l'hypothèse formulée sur le type d'inhibition que l'étude des courbes obtenues au moyen d'une seule représentation. De plus, on peut ainsi obtenir des valeurs plus exactes pour les constantes, difficiles à déterminer avec certitude d'après les intersections avec les axes ou les pentes d'une seule série de courbes.

Suivant l'équation de réaction (et en particulier le nombre de complexes intermédiaires) et le type d'inhibition représenté, les intersections et les pentes représenteront des constantes plus ou moins complexes qui n'auront pas forcément de signification physique.

Puisque l'on peut toujours exprimer la vitesse sous la forme d'une équation de MICHAELIS où V_m et K_m ne sont plus que des constantes apparentes, les différentes représentations graphiques se ramènent au cas le plus simple : celui où l'on envisage un seul complexe ES en équilibre avec les différents composés.

Les figures II à VII représentent les différentes formes d'inhibition selon les 6 représentations choisies, que nous avons appelé A, B, C, D, E et F.

A/ LINEWEAVER et BURK (38) ont proposé d'exprimer $1/v_i$ en fonction de $1/(S)$, v_i = vitesse en présence de l'inhibiteur.

B/ Ils ont aussi proposé de représenter $(S)/v_i$ en fonction de (S).

C/ Ce type de représentation proposé par HOFSTEE (39) représente v_i en fonction de $v_i/(S)$.

D/ Développé par DIXON (40) exprime $1/v_i$ en fonction de (I).

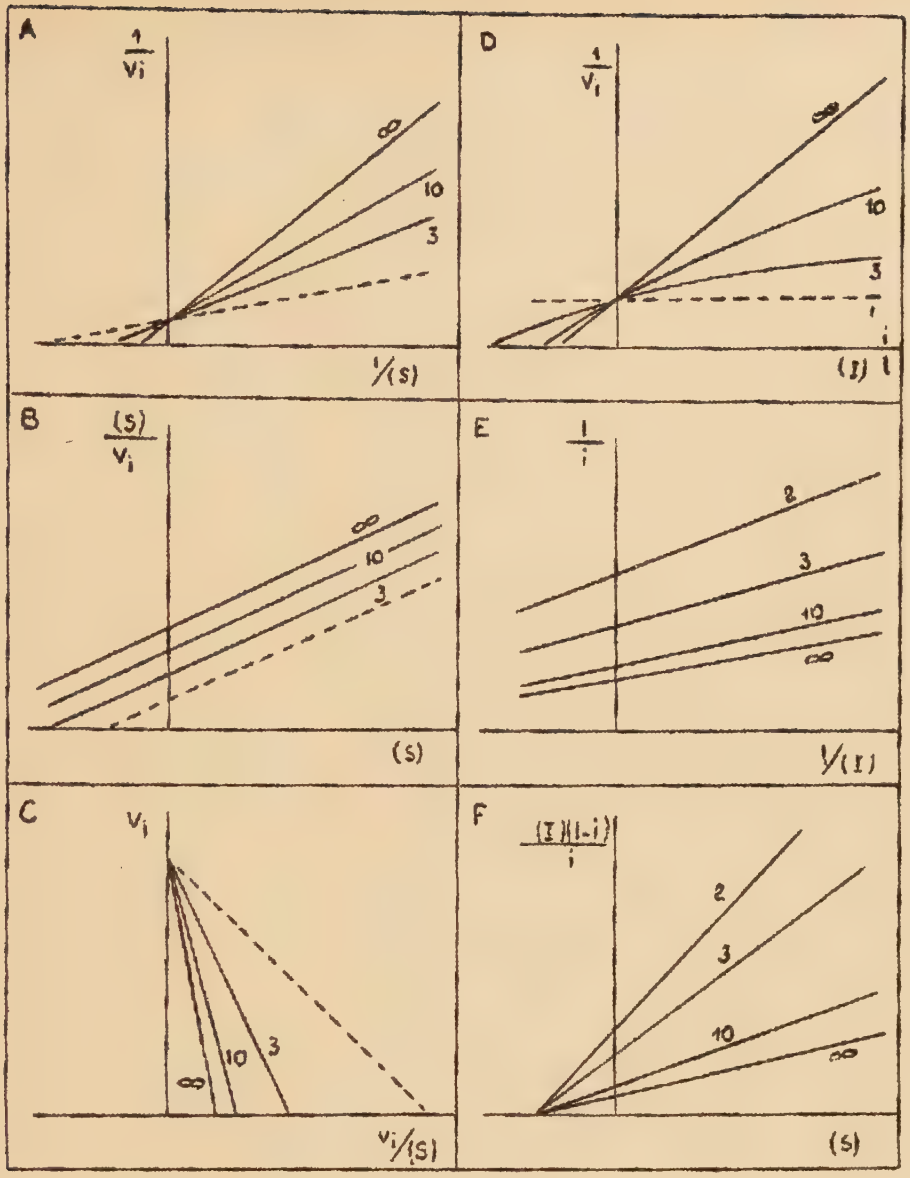


Figure 2 - Inhibition totalement (∞) et partiellement compétitive. Les chiffres sur les courbes sont les valeurs de la constante α . Les lignes pointillées représentent la réaction non-inhibée.

(Selon L. WEBB, p.159 "Enzyme and Metabolic Inhibitors. Acad. Press N.Y. 1963)

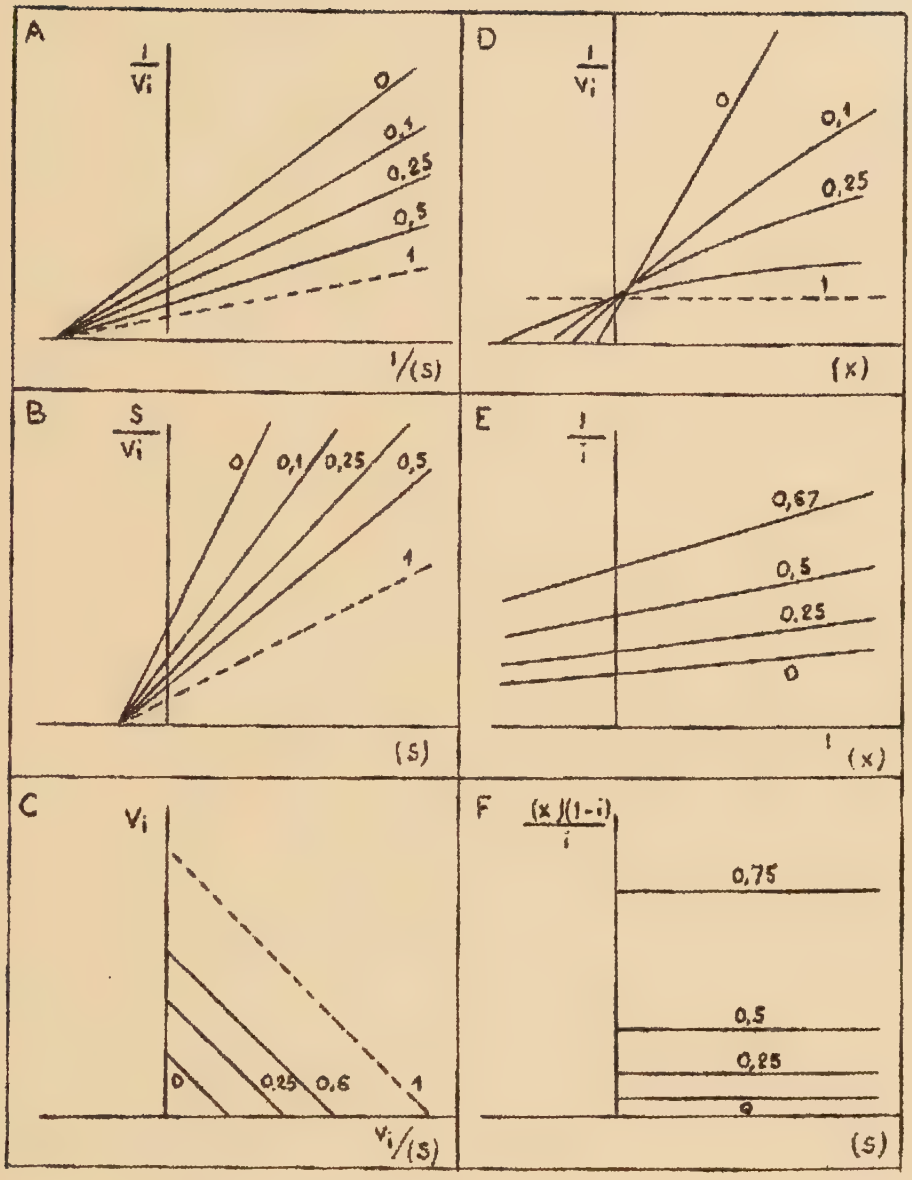


Figure 3 - Inhibition totalement (O) et partiellement non compétitive. Les chiffres sur les courbes sont les valeurs de la constante β .

(Selon L. WEBB, p. 161).

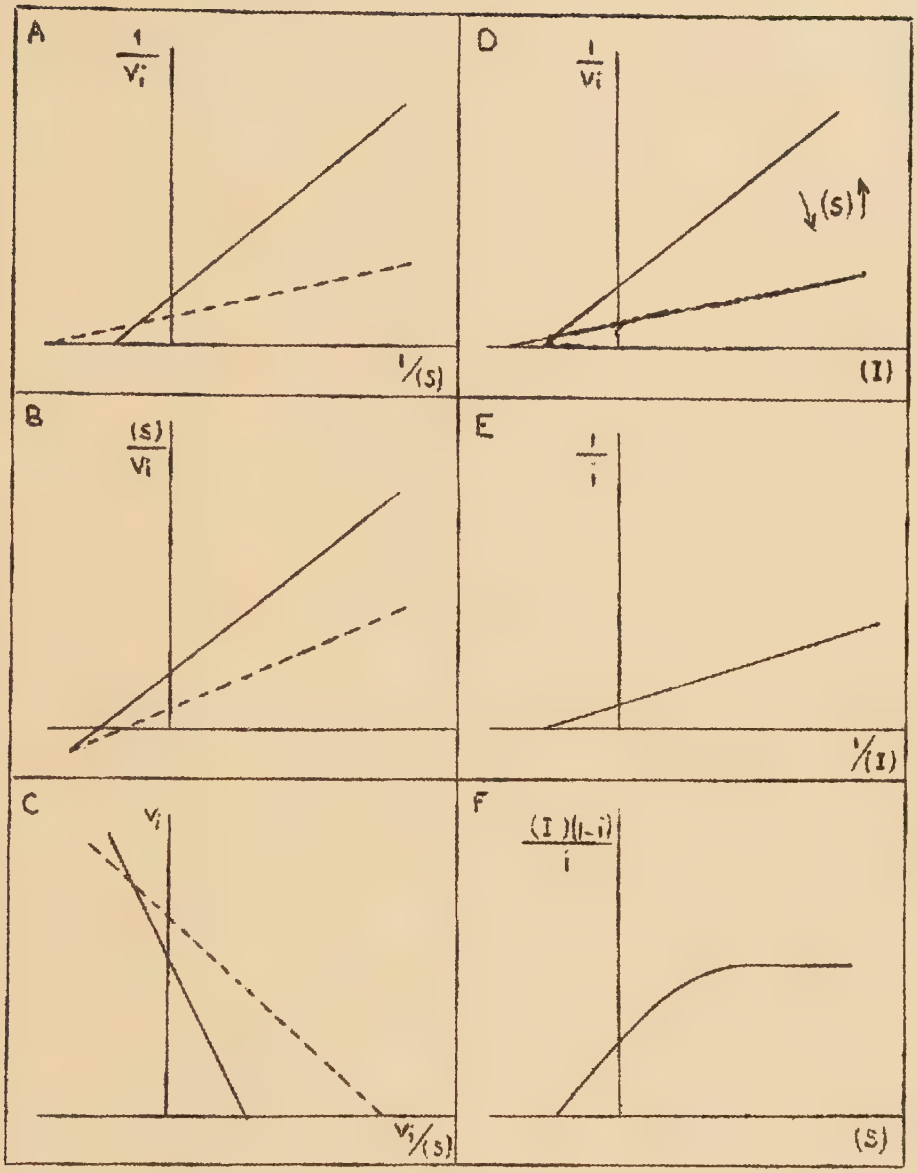


Figure 4 - Inhibition mixte.
(Selon L. WEBB, p. 162)

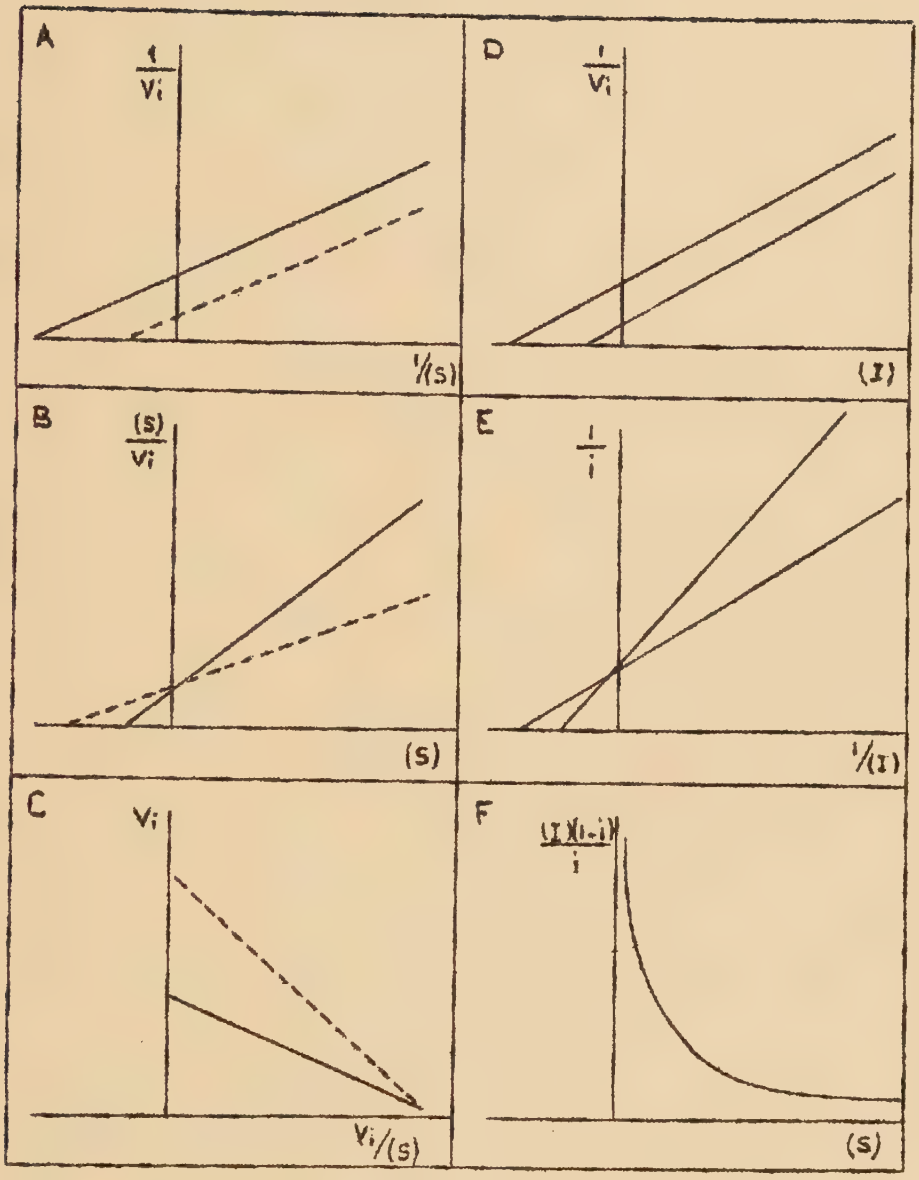


Figure 5 - Inhibition "uncompetitive"

(Selon L. WEBB, p. 166)

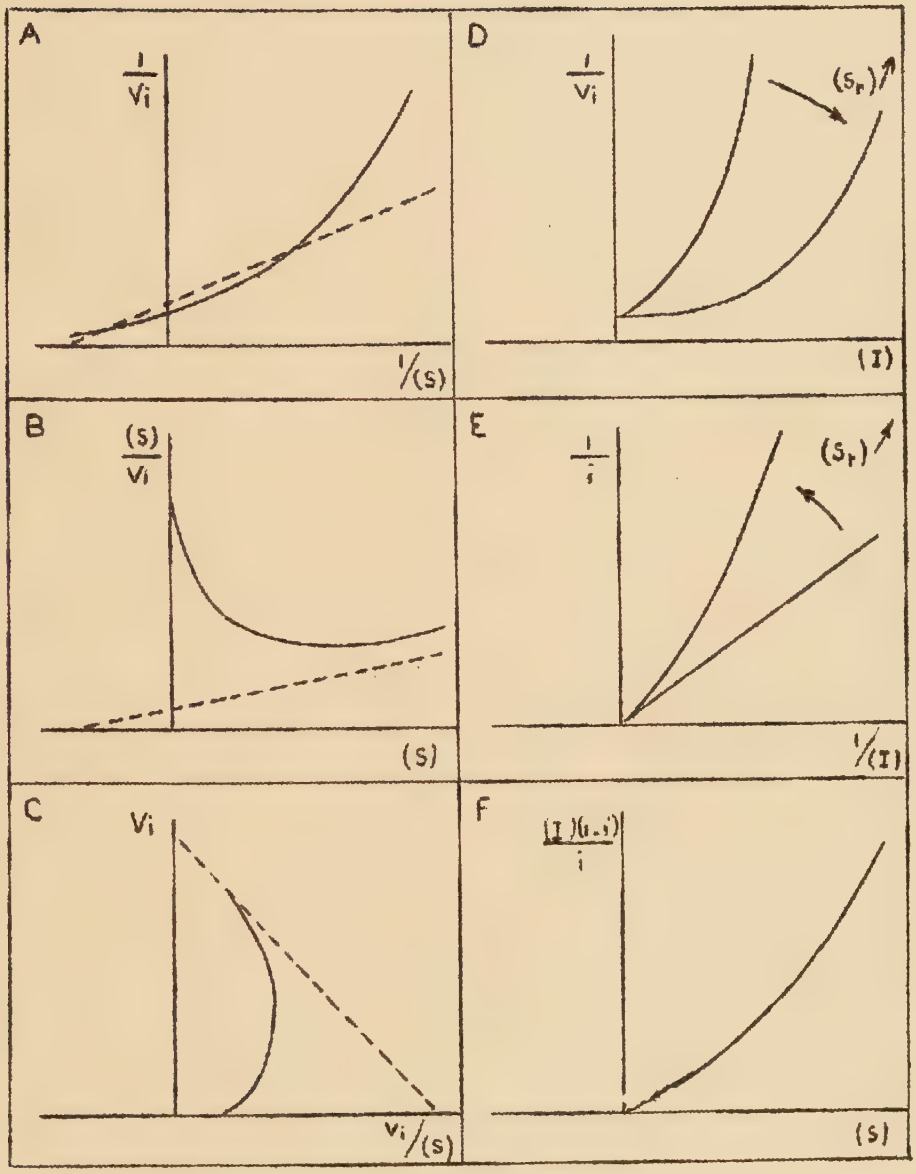


Figure 6 - L'inhibiteur réagit avec le substrat

I + S $\rightleftharpoons$ IS

(Selon L. WEBB, p. 173)

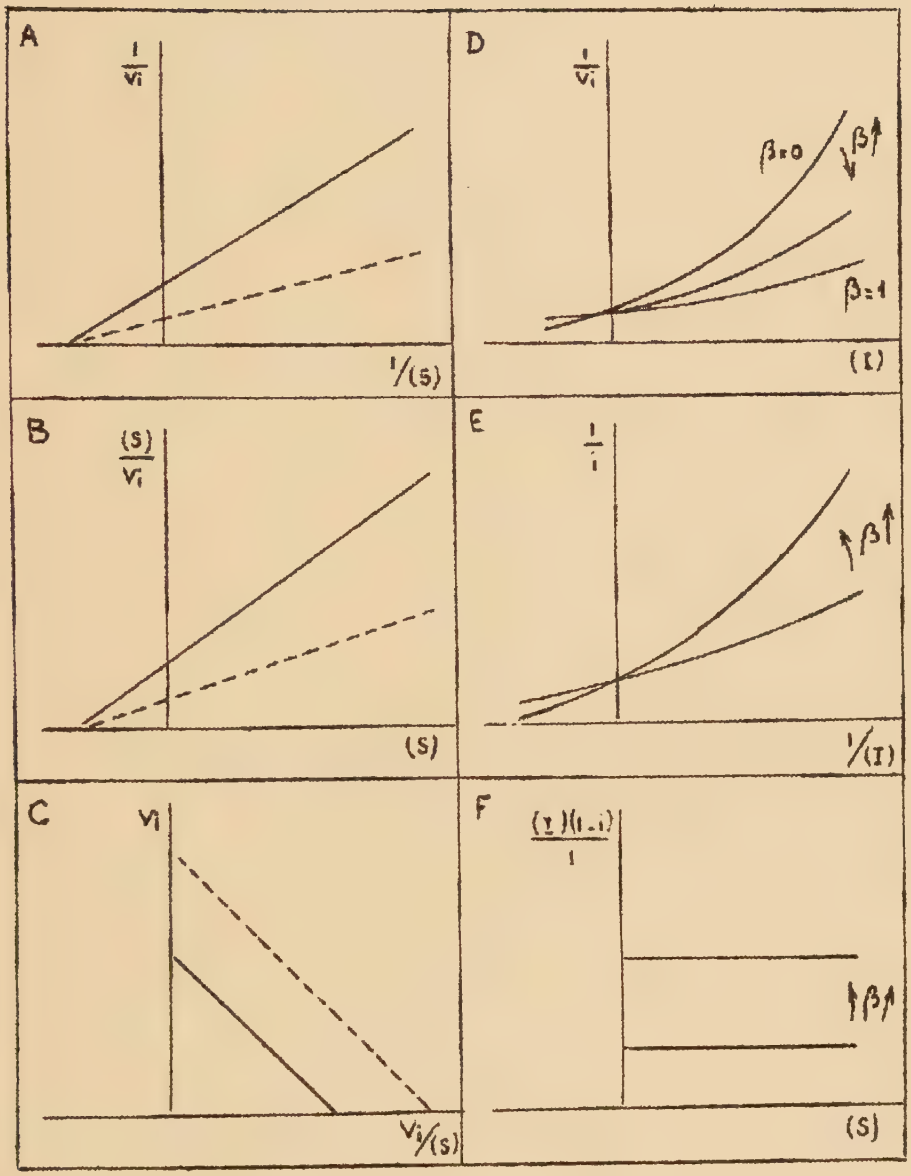


Figure 7 - Inhibition non-compétitive dans laquelle deux molécules sont liées à l'Enzyme ($\alpha = 1$)

(Selon L. WEBB, p. 175)

E/ Selon WEBB (41) exprime 1/i en fonction de 1/(I), avec i = pourcentage d'inhibition = $1 - v_i/v$

F/ Introduit par HUNTER et DOWNS (42) représente (I) (1 - i)/i en fonction de (S).

Les figures II, III, IV et V représentent l'inhibition compétitive (totalement et partiellement), non compétitive (totalement et partiellement), mixte et "uncompetitive," dans les 6 modes de représentation graphique choisis. Les figures VI et VII représentent de même le cas de formation d'un complexe SI et le cas où deux molécules d'inhibiteur se lient à l'Enzyme.

III_{32}) Etude cinétique de l'inhibition dûe au Saccharose

Pour faire l'étude cinétique du phénomène d'inhibition observé, nous avons traduit nos expériences dans les six représentations précédemment décrites. Les expériences consistent à mesurer la vitesse initiale soit à (S) constant et (I) variable, soit à (S) variable et (I) constant, pour une même concentration d'Enzyme (rapportée à 1 mg/ml), dans les conditions suivantes pH = 7, température 35°C, force ionique 0,1. La concentration du substrat (S) varie de 1,4 mg à 38 mg/ml ; celle du Saccharose (I) de 0 à 610 mg/ml (soit 1,78 M). On exprime la vitesse en ml de NaOH N/10 par minute par ml de solution pour 1 mg/ml de trypsine.

Il est possible de faire des expériences à de plus fortes concentrations en substrat (allant jusqu'à 100 mg/ml), mais il faut alors tenir compte des variations de force ionique dûes aux fortes quantités de soude nécessaires pour amener le pH initial à 7. Il convient alors d'opérer en ClNa 0,2 M et d'employer de la soude 0,2 M. (Communication de Mlle MONNOT et Mme WEINTRAUB). C'est pourquoi nous n'avons pas dépassé 38 mg/ml.

Ce genre d'expérience permet de mettre en évidence l'activation par les fortes concentrations en substrat et de déterminer les constantes correspondantes.

L'étude cinétique faite dans les six représentations décrites précédemment nous a donné les renseignements suivants :

- l'inhibition par le Saccharose conserve le phénomène d'activation par le substrat lui-même ;
- l'inhibition se fait par une liaison Sucre-Protéine ; elle est liée à la nature protéique du substrat ;
- l'inhibition est du type totalement non compétitif ;
- l'inhibition met en jeu plus d'une molécule d'inhibiteur.

III_{321}) - <u>L'inhibition conserve le phénomène d'activation</u>.

Envisageons tout d'abord la représentation d'EADIE.

$$v = V_m - K_m \, v/(S)$$

La pente de la droite représente K_m

La courbe 1 de la figure VIII établie selon ce mode de représentation, nous montre que la vitesse ne reste pas proportionnelle à v/(S). Nous retrouvons le phénomène d'activation par le substrat : la fixation sur l'Enzyme d'une deuxième molécule de substrat entraîne des interactions d'affinité. Cet effet coopératif se traduit par une augmentation importante de la vitesse de la réaction. On peut décomposer la courbe en trois parties : deux droites de pentes différentes séparées par une portion de courbe.

En dessous de 4 mg/ml, les points expérimentaux sont alignés et donnent une valeur de K_m d'environ 2,7 mg/ml.

Nos expériences ont été faites le plus souvent dans une gamme de concentration allant de 6 à 15 mg/ml. Nous n'avons pas suffisamment de points expérimentaux à fortes concentrations pour exprimer la valeur du K_m correspondant. Le tableau III résume ces données.

Sur la figure VIII les courbes 2 et 3 expriment les résultats des protéolyses trypsiques de β-Lactoglobuline A en présence de Saccharose 0,45 et 0,8 M. Les courbes sont parallèles L'inhibition dûe au Saccharose n'interviendrait donc en aucune façon sur l'activation par fixation d'une deuxième molécule de substrat sur l'Enzyme. La figure IX confirme ce résultat : expériences identiques mais faites en présence de Saccharose 0,5 M.

Les représentations A et B dont la dispersion est très différente, confirment aussi ce résultat et nous donnent les mêmes valeurs de K_m (Fig. X et XI).

En effet, si nous exprimons 1/v en fonction de 1/(S) (représentation A)

$$1/v = 1/V_m + K_m /(S)V_m$$

l'intersection des portions linéaires avec l'axe des abscisses est $- 1/K_m$.

Si nous représentons (S)/v en fonction de (S) (représentation B)

$$(S)/v = (S)/V_m + K_m /V_m$$

l'intersection des portions linéaires avec l'axe des abscisses est $- K_m$.

Dire que le sucre n'intervient pas dans l'activation par le substrat, revient à dire que le pourcentage d'inhibition dûe au sucre dans les conditions où nous opérons, c'est-à-dire

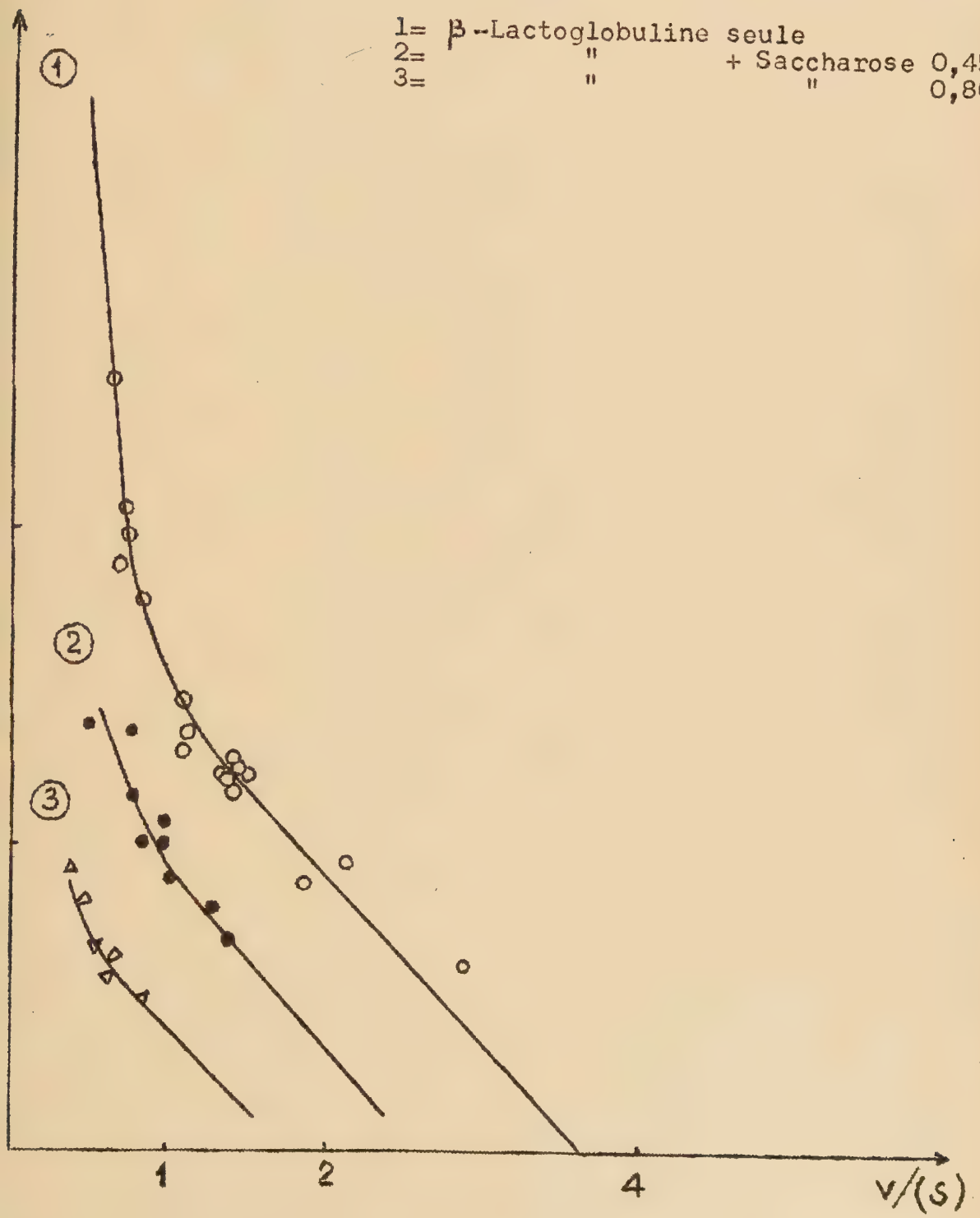
TABLEAU III

Concentration en β-Lactoglobuline A	K_m apparent
de 0 à 4 mg/ml	2,7 mg/ml
$>$15 mg/ml	non déterminé

Figure 8

v est exprimé en mm3 NaOH N/10 par minute et pour 1 mg/ml de Trypsine
(s) est exprimé en mg de β-Lactoglobuline par ml

1= β-Lactoglobuline seule
2= " + Saccharose 0,45 M
3= " " 0,80 M



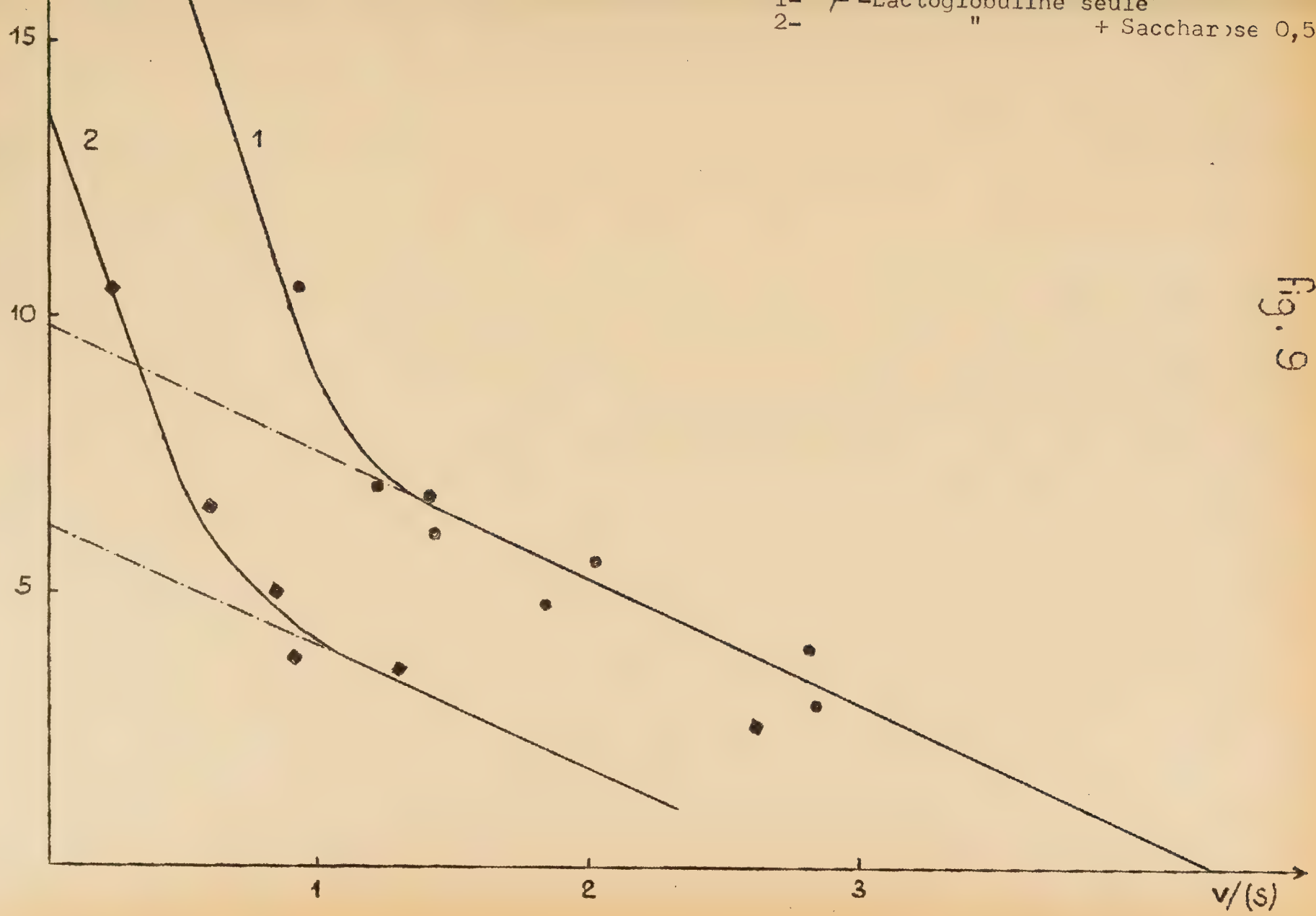
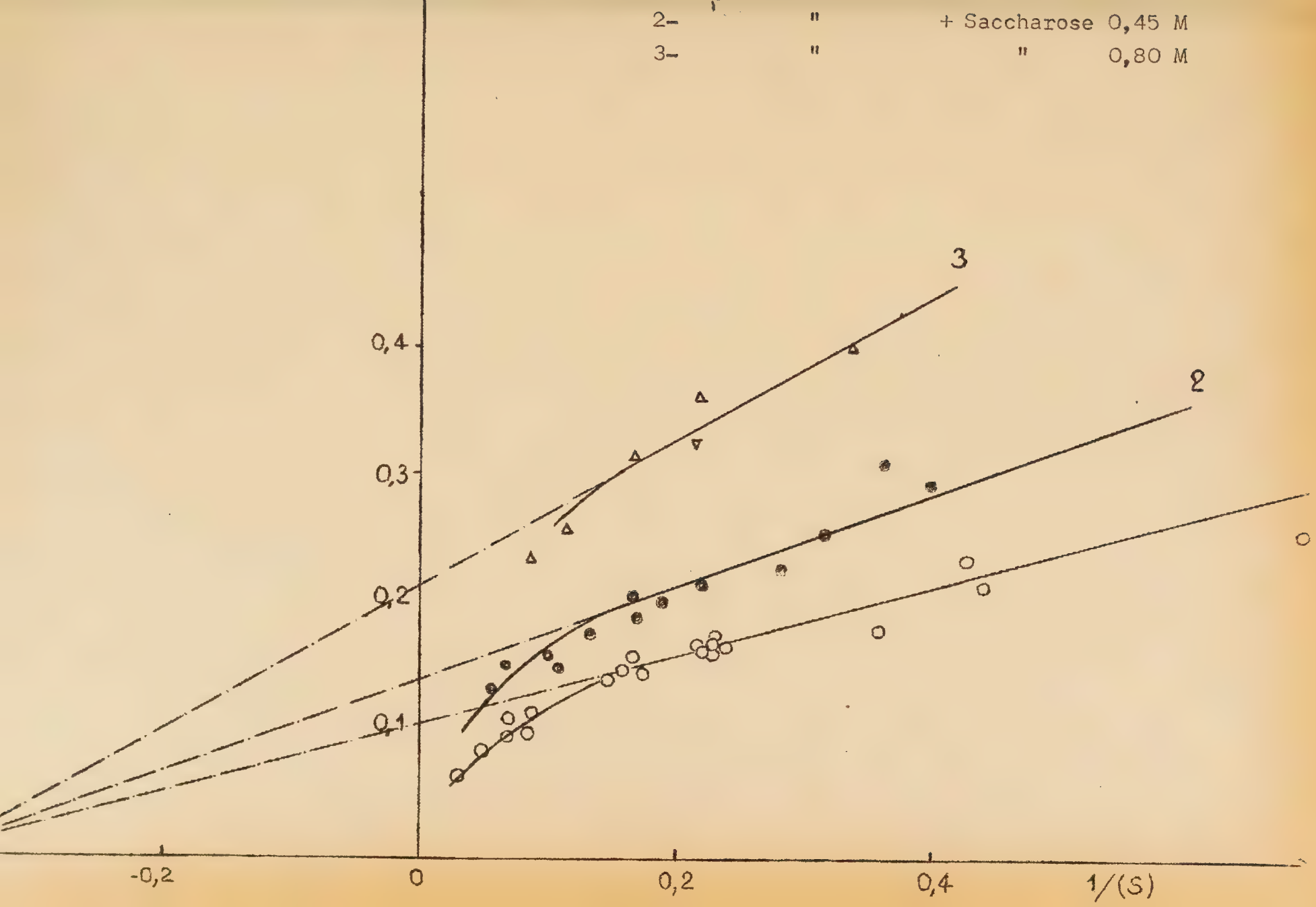
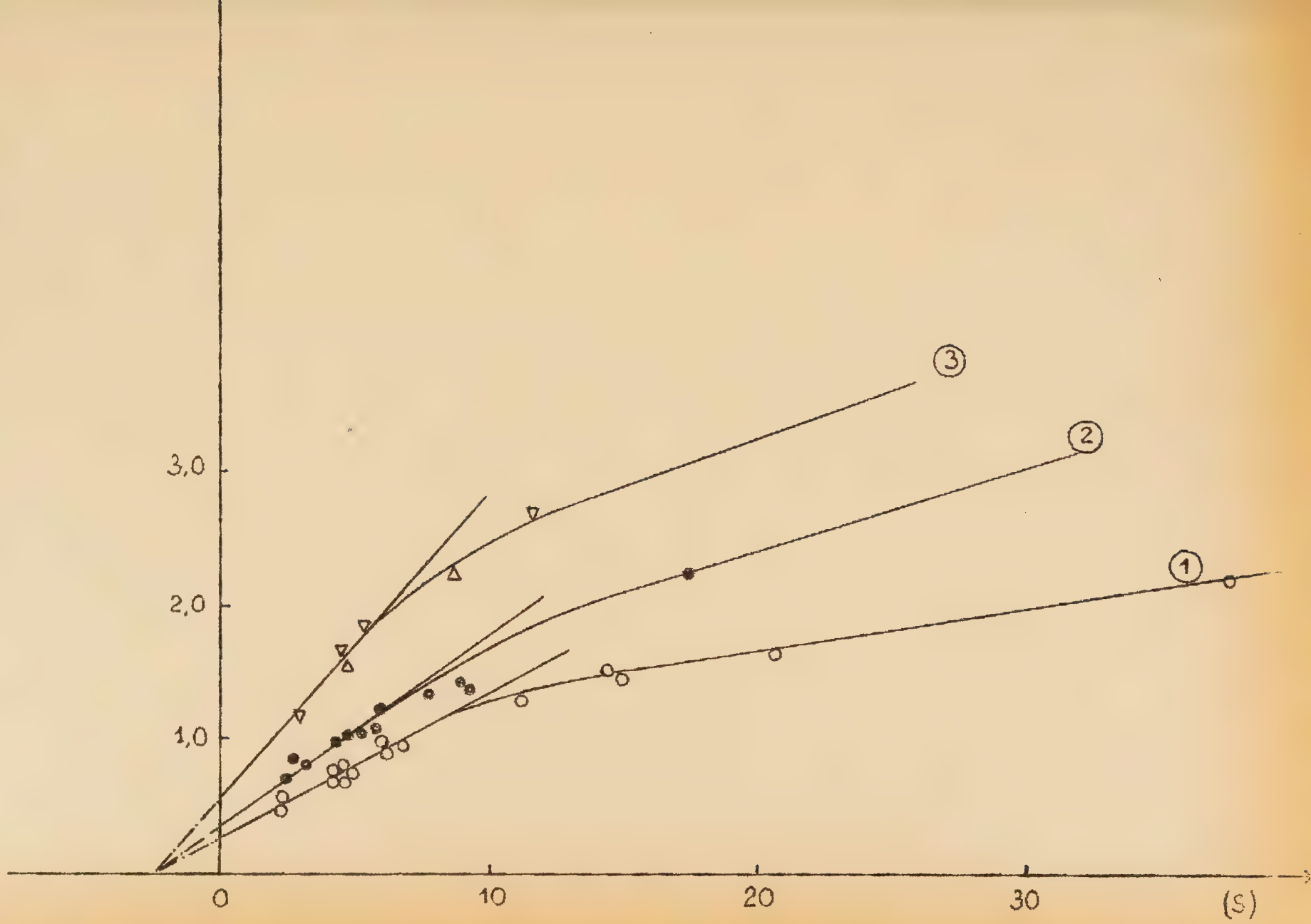


Fig. 9


2- " + Saccharose 0,45 M
3- " " 0,80 M
3
2
0,4
0,3
0,2
0,1
-0,2
0
0,2
0,4
1/(S)


3,0
2,0
1,0
0
10
20
30
(s)
1
2
3

avec un excès d'inhibiteur, ne dépend que de la concentration de l'inhibiteur et non de celle du substrat. Or, c'est exactement ce que nous observons : quelle que soit la concentration de Lactoglobuline, le Saccharose 0,45 M entraîne une inhibition de 25 % environ ; le Saccharose 0,8 M de 60 % environ. Ceci est confirmé par la courbe de la fig. XV qui exprime (I) $(\frac{1-i}{i})$, en fonction de (S).

III_{322}) L'inhibition se fait par une liaison Sucre-Protéine. Elle dépend de la nature protéique du Substrat.

Nous observons un phénomène d'inhibition tout à fait analogue en changeant d'enzyme, alors que l'inhibition disparaît plus ou moins lorsqu'on change de substrat. Seuls les substrats protéiques paraissent affectés par la présence de Saccharose.

a) Résultats comparés avec la Trypsine et l'α-Chymotrypsine.

- Nous avons tracé une courbe semi-logarithmique avec la Trypsine et l'α-Chymotrypsine, en représentant la vitesse initiale en fonction de log 1/(I) [(I) = concentration en Saccharose] [fig. XII et XIII], pour une concentration en substrat de 6 mg/ml dans les deux cas.

Ces deux courbes sont absolument comparables et donnent des pourcentages d'inhibition du même ordre de grandeur pour des concentrations identiques en inhibiteur, comme le montre le Tableau IV.

La concentration de Saccharose qui produit une inhibition de 50 % est du même ordre de grandeur pour les deux enzymes.

$I_{0,5}$ = 0,8 M pour l'α-Chymotrypsine

$I_{0,5}$ = 0,7 M pour la Trypsine

I est exprimé en mg/ml -
Protéolyses trypsiques

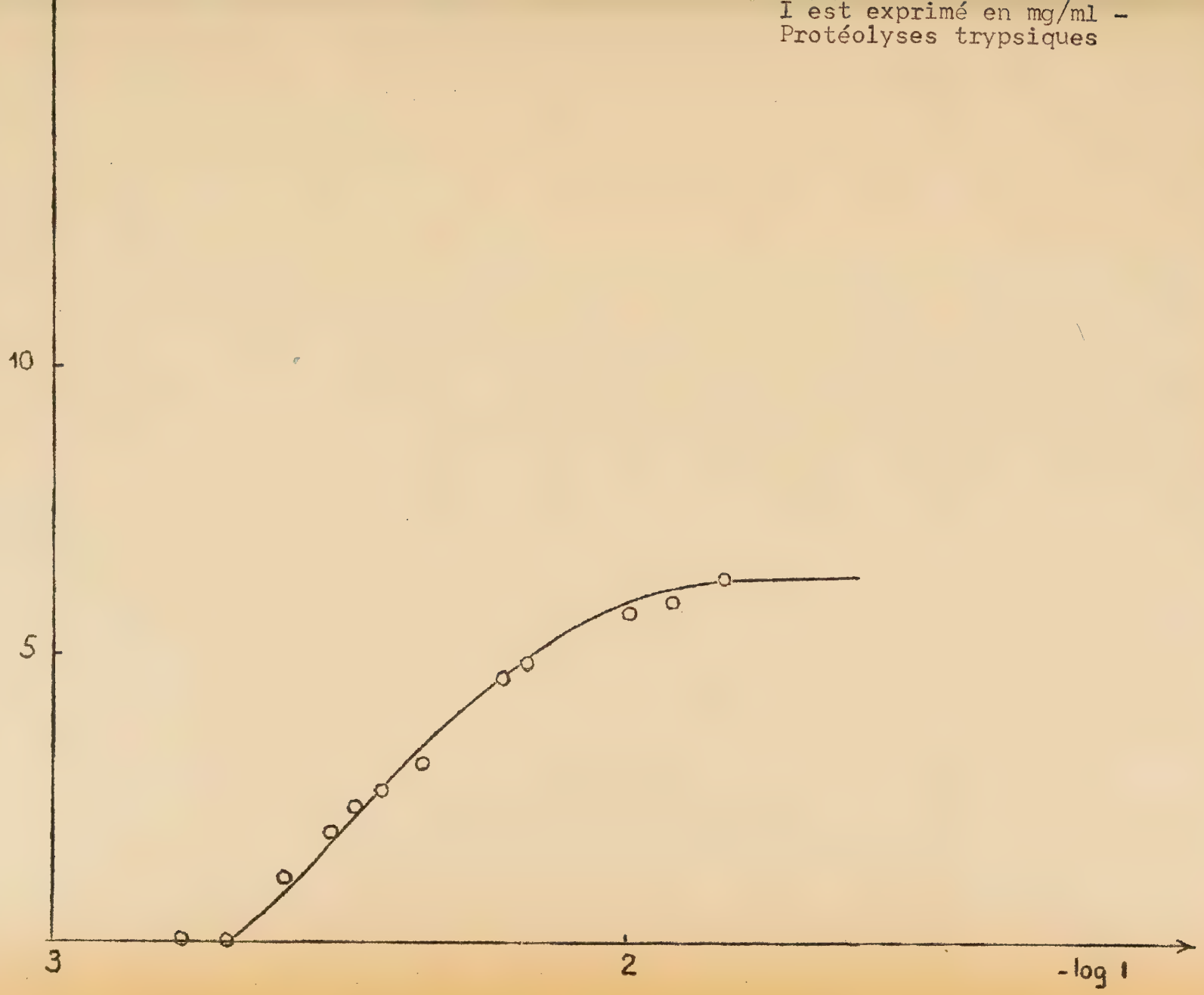


Figure 13

même expérience que celle de la figure 12 faite ici en présence d'α- chymotrypsine.

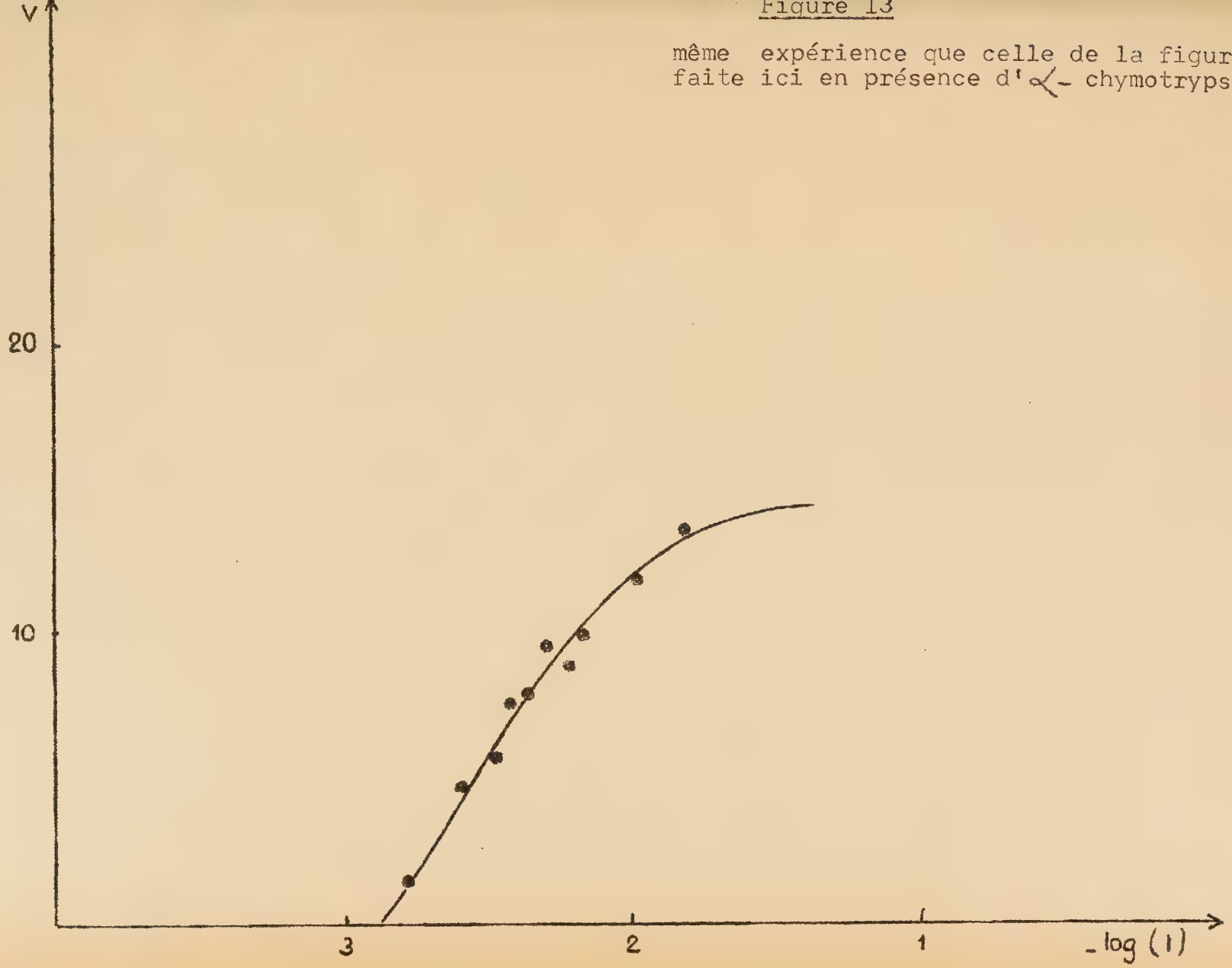


TABLEAU IV

β-Lactoglobuline A	Saccharose	i	
		Trypsine	α-Chymotrypsine
6,04 mg/ml	0,45 M	23 %	27 %
" "	0,8 M	58 %	5I %
" "	1,5 M	100 %	83 %

i = pourcentage d'inhibition

Nous verrons d'autre part, plus loin, que plusieurs molécules de Saccharose doivent se lier à la molécule de Lactoglobuline et qu'il en est de même quel que soit l'enzyme employé : les courbes des représentations D et E (fig. XVI à XIX) sont tout à fait analogues dans les cas de l'hydrolyse trypsique ou chymotrypsique. Il n'y a donc pas d'effet spécifique sur la Trypsique.

b) Résultats comparés avec d'autres substrats;

- Nous avons obtenu des résultats très différents lorsque nous avons au contraire changé de substrat. Nous avons utilisé la β-Lactoglobuline A dénaturée par la chaleur sous sa forme "f" et le TSAME.

- Avec la protéine dénaturée nous obtenons une inhibition beaucoup plus faible, de plus de moitié (Tableau V).

Cette diminution ne peut être liée qu'à la modification de la structure de la protéine substrat puisque toutes choses sont égales par ailleurs.

- TSAME.

Nous faisons l'expérience dans les mêmes conditions que précédemment. La seule précaution supplémentaire consiste à mesurer la dérive dûe à l'hydrolyse spontanée, non enzymatique du TSAME, à cette température et ce pH. Nous retrouvons l'activation montrée par J.J. BECHET (12) (fig. XIV), aux fortes concentrations de substrat mais aucune inhibition par le Saccharose, au contraire une légère activation. Cette activation est résumée dans le Tableau VI et paraît presque disparaître aux fortes concentrations de substrat.

L'activation, à peine significative aux faibles concentrations de substrat, correspond peut-être à un abaissement de la constante diélectrique du milieu qui est dans ces expériences,

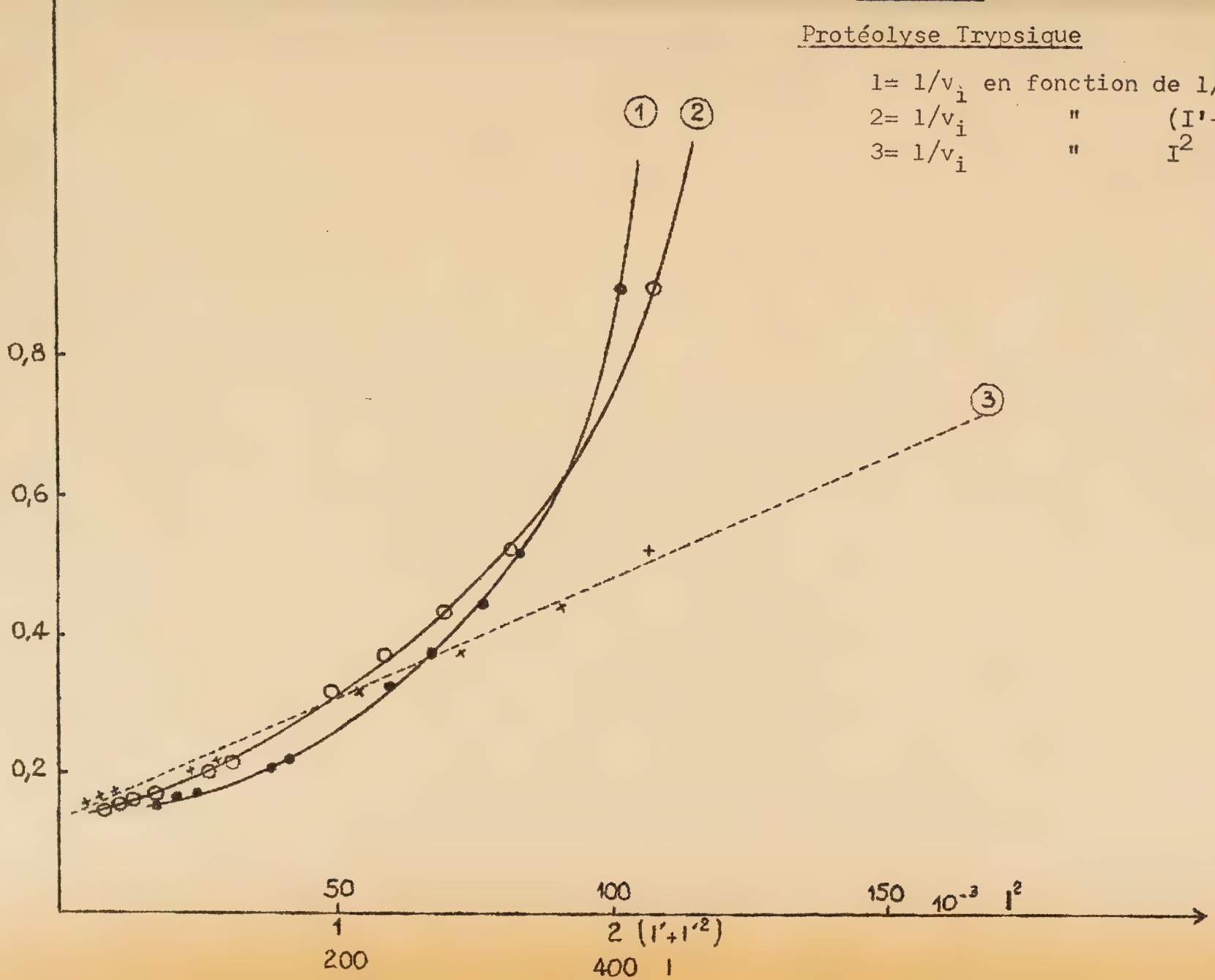
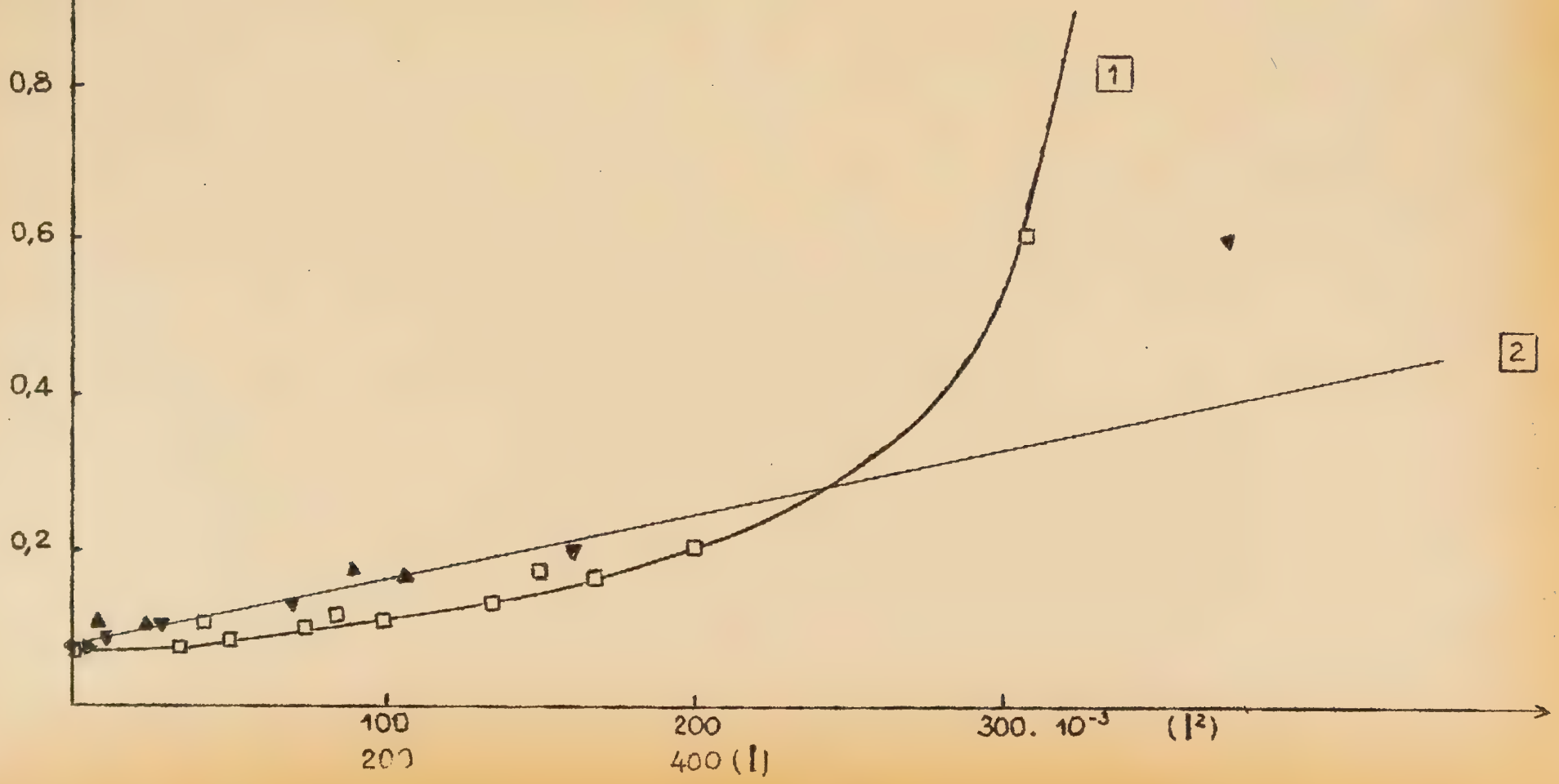

Protéolyse Trypsique
1= 1/v_i en fonction de 1/I
2= 1/v_i " (I'+I'^2)
3= 1/v_i " I^2
1
2
3
0,8
0,6
0,4
0,2
50
100
150
10^-3 I^2
1
2 (I'+I'^2)
200
400 I

Figure 17

Protéolyse α-Chymotrypsique

1= $1/v_i$ en fonction de I

2= $1/v_i$ " I^2



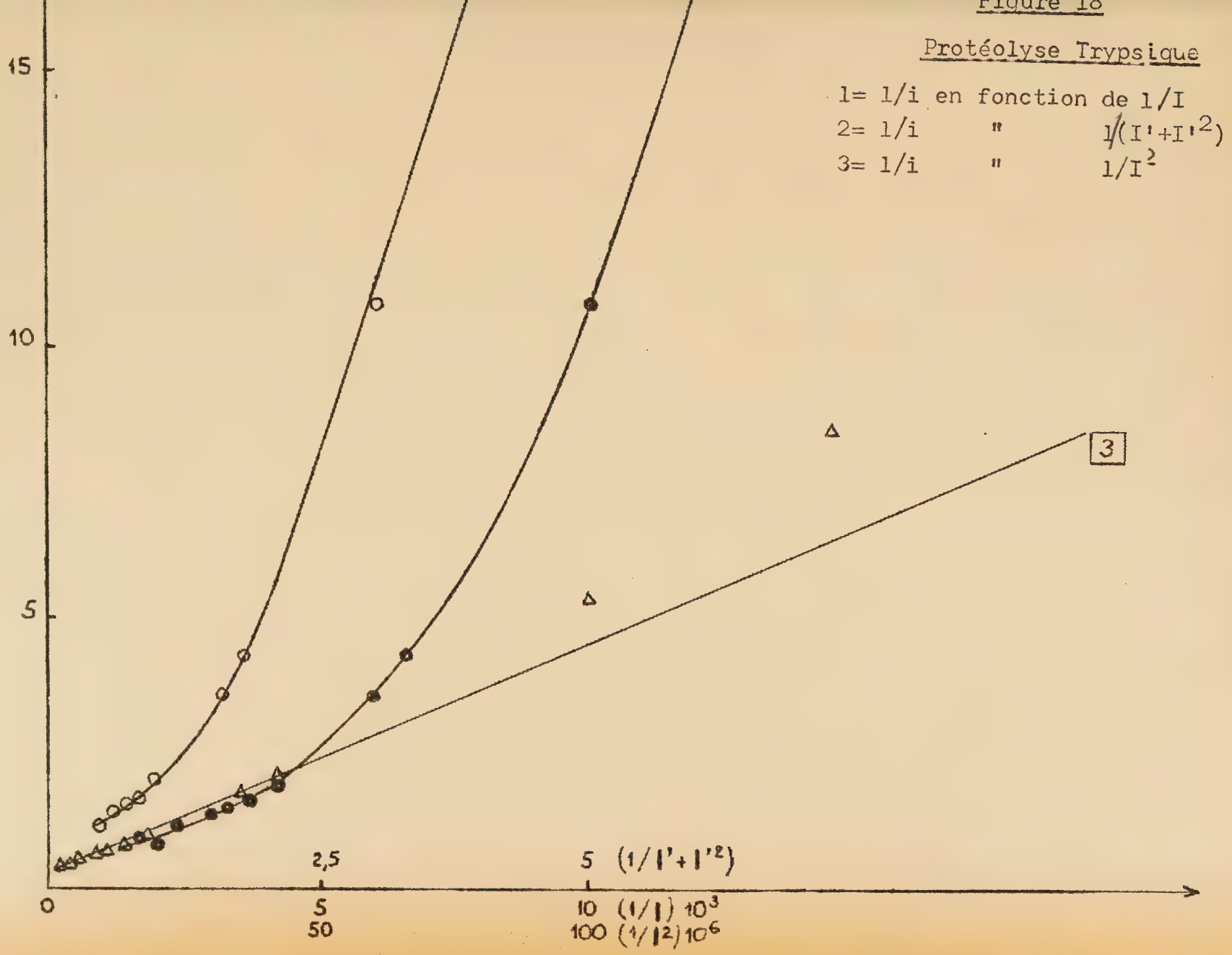


Figure 18
Protéolyse Trypsique
1= 1/i en fonction de 1/I
2= 1/i " 1/(I'+I'²)
3= 1/i " 1/I²
15
10
5
0
2,5
5 (1/I'+I'²)
5
50
10 (1/I) 10³
100 (1/I²) 10⁶
3

Figure 19

α -Chymotrypsine

1=1/i en fonction de 1/I

2=1/i " 1/I²

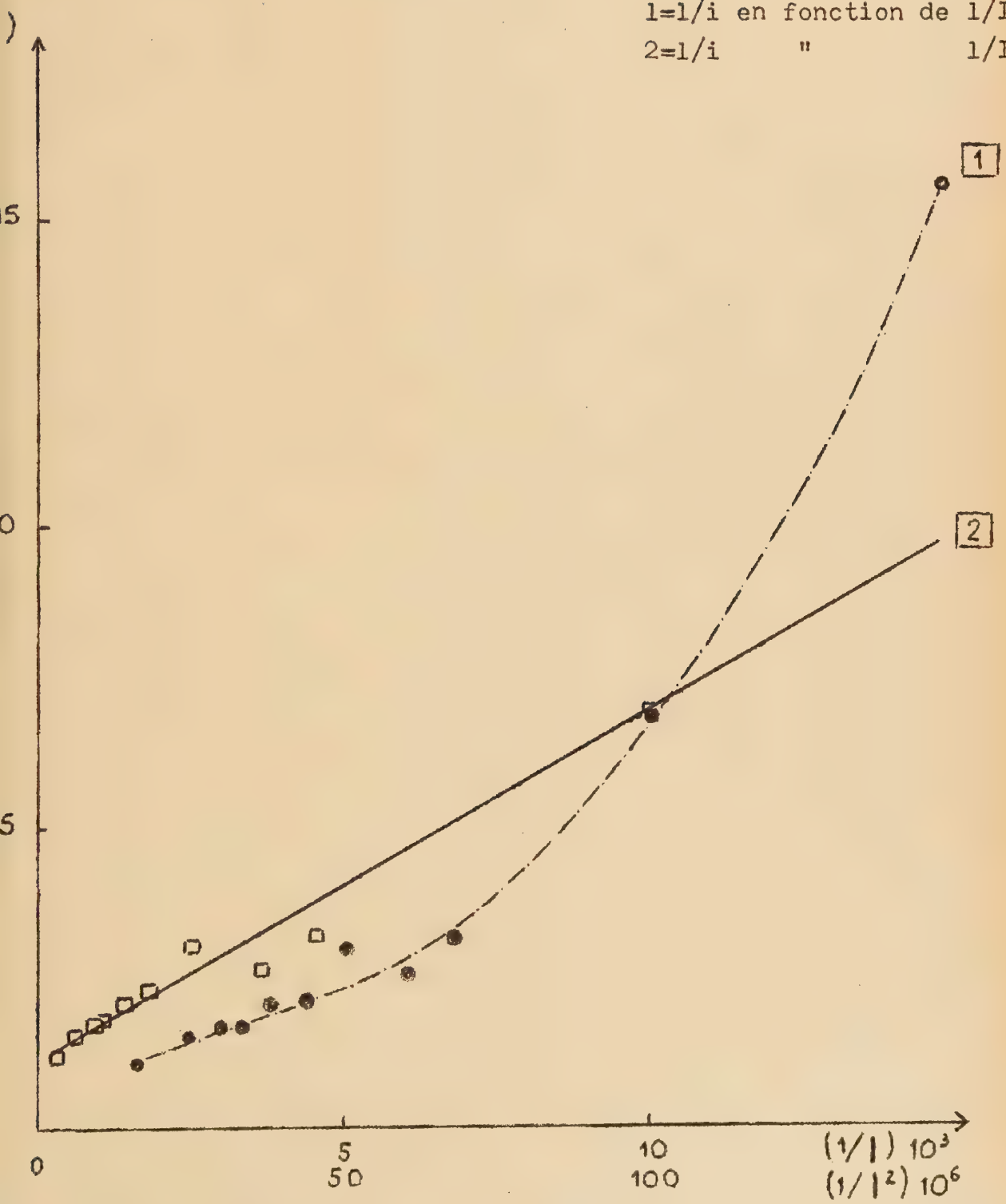


TABLEAU V

β-Lactoglobuline A dénaturée	Saccharose	i
5,94 mg/ml	0,4 M	10 %
5,94 "	0,8 M	22 %
5,96 "	0,7 M	2I %
2,98 "	0,4 M	0 %
2,98 "	0,7 M	24 %
β-Lactoglobuline A native	**Saccharose**	**i**
6,04 mg/ml	0,45 M	23 %
6,04 "	0,7 M	5I %
6,04 "	0,8 M	58 %

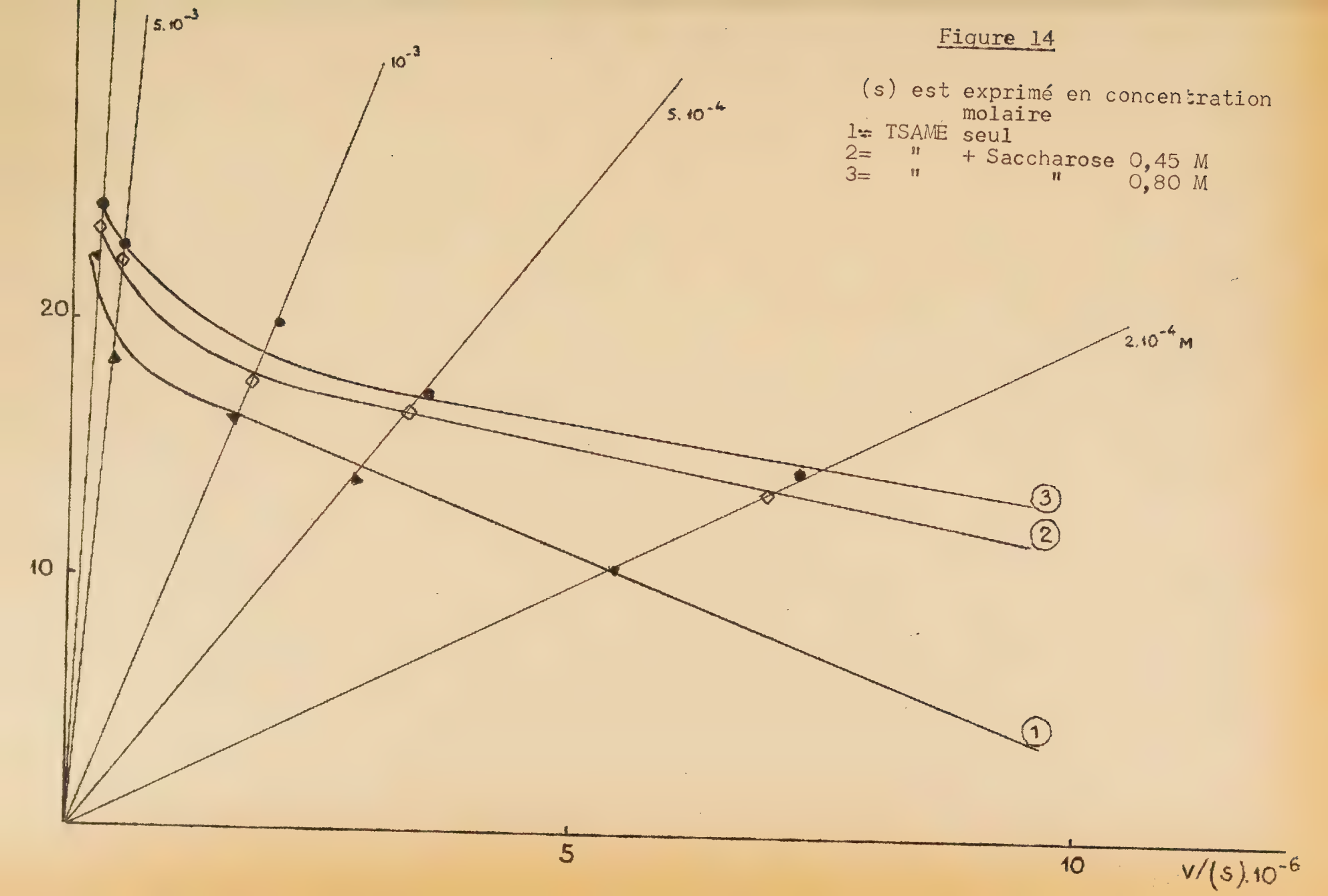


Figure 14
(s) est exprimé en concentration molaire
1= TSAME seul
2= " + Saccharose 0,45 M
3= " " 0,80 M
5.10^-3
10^-3
5.10^-4
2.10^-4 M
20
10
5
10
V/(S).10^-6
1
2
3

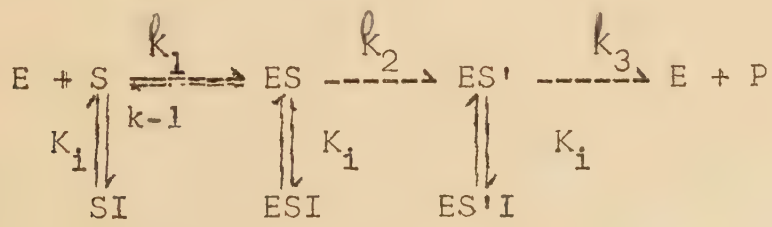
TABLEAU VI

Saccharose	TSAME	Pourcentage d'activation
0,45 M	10^{-4} M	+ 7 %
0,45 M	10^{-4} M	+ 5 %
0,45 M	2.10^{-4} M	+ 28 %
0,45 M	5.10^{-4} M	+ 20 %
0,45 M	5.10^{-4} M	+ 8 %
0,45 M	10^{-3} M	+ 9 %
0,45 M	10^{-3} M	+ 17 %
0,45 M	5.10^{-3} M	+ 4 %
0,45 M	10^{-2} M	0
0,45 M	5.10^{-2} M	0
0,8 M	2.10^{-4} M	+ 33 %
0,8 M	5.10^{-4} M	+ 25 %
0,8 M	5.10^{-4} M	+ 27 %
0,8 M	10^{-3} M	+ 24 %
0,8 M	5.10^{-3} M	+ 21 %
0,8 M	10^{-2} M	+ 9 %
0,8 M	5.10^{-2} M	+ 8 %
0,8 M	5.10^{-2} M	+ 4 %

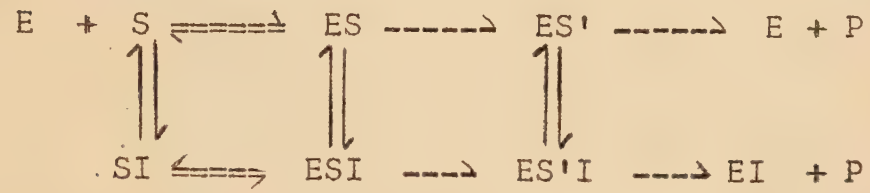
d'environ 10 unités ; ces résultats sont en accord avec ceux de J.J. BECHET sur l'effet des variations de la constante diélectrique (communication personnelle) ; ils nous permettent de conclure que l'effet du Saccharose s'exerce sur le substrat et non sur l'enzyme. Il y a donc une liaison Sucre-Lactoglobuline et celle-ci dépend de la structure de la protéine substrat. L'inhibition qui en résulte est beaucoup plus importante lorsque la protéine est native.

III_{323}) L'inhibition est du type totalement non compétitif.

Nous avons vu que pour écrire l'équation de la réaction, nous pouvons faire appel à deux hypothèses : équilibre ou état stationnaire. Nous avons choisi cette dernière hypothèse car s'il est impossible d'établir avec certitude l'existence d'un équilibre pour les deux complexes, un état stationnaire, au moins dans les premières minutes de la réaction, est plus plausible. Or, graphiquement, nous ne pouvons avoir (cf. p. 18) dans le cas de l'état stationnaire, d'effet non compétitif simple, à moins de supposer que l'inhibition est "totale", c'est-à-dire que la liaison de l'inhibiteur avec l'un quelconque des composés du système entraîne un arrêt de la réaction. C'est pourquoi les fig. VIII, X et XI qui expriment la variation de la vitesse en fonction du substrat (représentation C, A, B), et montrent une inhibition non compétitive, nous conduisent au schéma suivant :



En effet, ainsi que le fait remarquer REINER (43), un schéma d'inhibition non compétitive "partielle" du type :



entraîne une expression de la vitesse qui ne s'annule jamais même aux fortes concentrations d'inhibiteur (comme nous pouvons aisément le vérifier p. 18). La vitesse correspondant à l'inhibition non compétitive "totale" est :

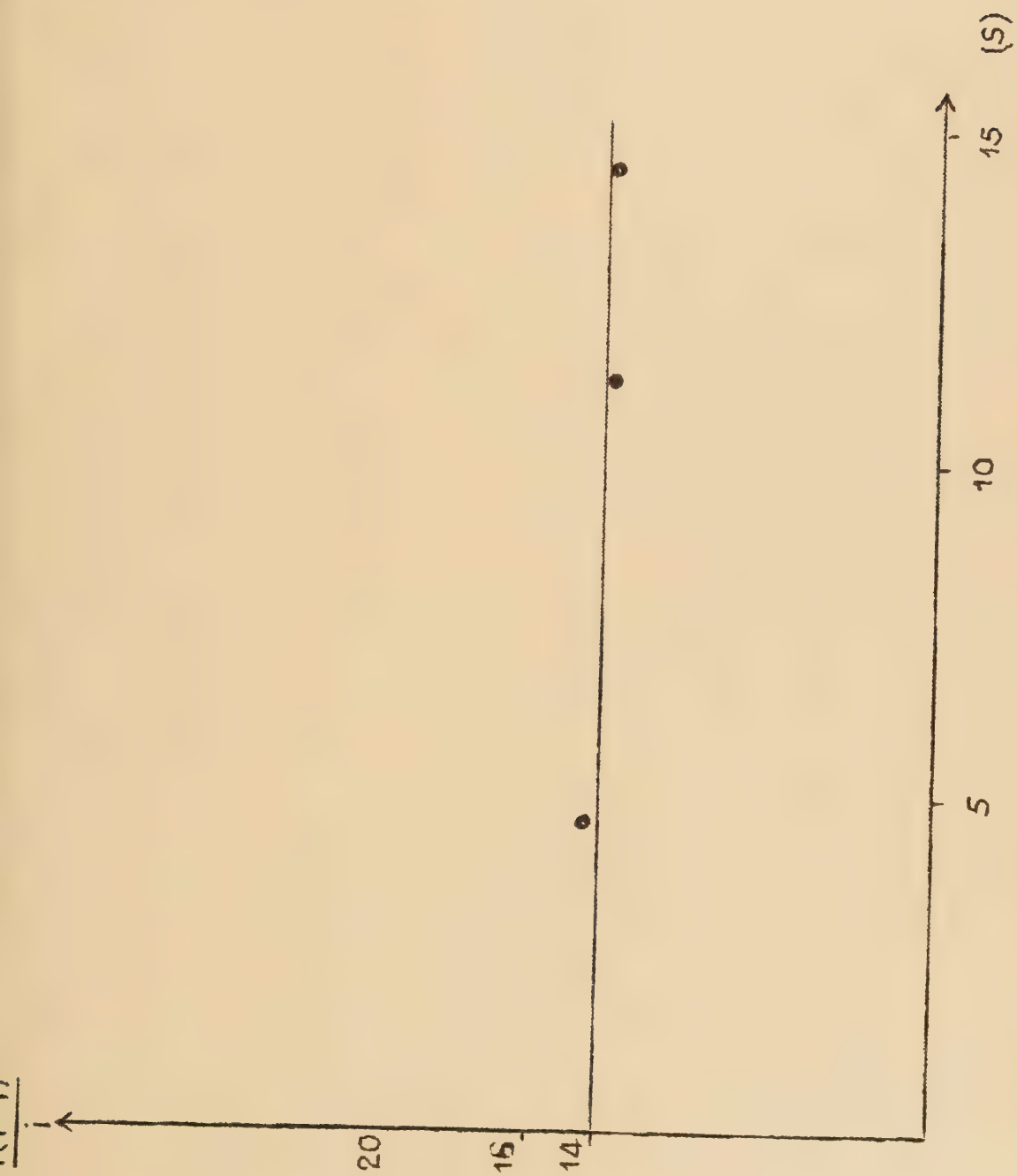
$$v = \frac{V_m\,(S)}{(1 + (I)/K_i)\,(K_m + (S))}$$

Des représentations D, E, F, seule F (fig. XV) reste compatible avec notre hypothèse d'inhibition non compétitive totale. En effet, les courbes D et E (courbes 1 des fig. XVI et XVIII) qui expriment $1/v_i$ en fonction de (I) et 1/i en fonction de 1/(I), ne sont plus linéaires. Il ne nous reste plus qu'une hypothèse supplémentaire possible : plusieurs molécules d'inhibiteur se lient au substrat. Dans ce cas, et dans celui-là seulement, comme nous le montre l'examen des courbes tracées dans tous les cas possibles, les courbes des six représentations sont cohérentes.

III_{324}) Plusieurs molécules d'inhibiteur sont liées à la Protéine-Substrat.

Supposons tout d'abord que deux molécules de Saccharose se fixent par molécule de substrat en un point différent du site de fixation de l'Enzyme, le schéma de la réaction devient :

fig. 15



$$
\begin{array}{ccccccc}
E + S & \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} & ES & \xrightarrow{k_2} & ES' & \xrightarrow{k_3} & E + P \\
\Big\updownarrow K_i & & \Big\updownarrow K_i & & \Big\updownarrow K_i & & \\
SI & & ESI & & ES'I & & \\
\Big\updownarrow \delta K_i & & \Big\updownarrow \delta K_i & & \Big\updownarrow \delta K_i & & \\
SI_2 & & ESI_2 & & ES'I_2 & &
\end{array}
$$

L'expression de la vitesse est :

$$v_i = \frac{V_m\,(S)}{\left[(S) + K_m\right] \quad (1 + (I)/K_i + (I^2)/K_i^2\,\delta}$$

avec $V_m = \dfrac{k_2 k_3 E_t}{k_2 + k_3}$ et $K_m = \dfrac{k_3\,(k_{-1} + k_2)}{(k_2 + k_3)\,k_1}$

Les valeurs des pentes et des intersections dans les différentes représentations sont complexes et ne permettent pas d'atteindre directement les constantes de vitesse.

- A -

Nous obtenons :

$$1/v_i = \frac{(1 + (I)/K_i + (I^2)/\delta K_i^2}{V_m} + \frac{K_m\,(1 + (I)/K_i + (I^2)/\delta K_i^2)}{(S)\,V_m}$$

- B -

$$\frac{(S)}{v_i} = \frac{(S)\,(1 + (I)/K_i + (I^2)/\delta K_i^2)}{V_m} + \frac{K_m\,(1 + (I)/K_i + (I^2)/\delta K_i^2)}{V_m}$$

- C -

$$v_i = \frac{V_m}{(1 + (I)/K_i + (I^2)/\delta K_i^2)} - \frac{v_i\ K_m}{(S)}$$

- D -

$$\frac{1}{v_i} = \frac{(1 + K_m/(S)}{V_m} + \frac{\left[1 + K_m/(S)\right]\ \left[(I)/K_i + (I^2)/\delta K_i^2\right]}{V_m}$$

Rappelons que δ est le coefficient qui exprime le changement d'affinité de la protéine pour le sucre, dû à la liaison de la première molécule.

- Si $\delta = 1$,

$1/v_i$ est une fonction linéaire de $(I)K_i + (I^2)/K_i^2$.

Si nous posons $(I)/K_i = (I')$ la "concentration réduite (cf. p.20), l'allure générale de la courbe $1/v_i = f((I') + (I'^2))$ est la même que celle de $1/v_i = f((I) + (I^2))$. Cependant, dans le cas où $\delta = 1$, nous pouvons calculer K_i à partir de la valeur $(I)_{0,5}$ de la courbe XII et tracer $1/v_i$ en fonction de $((I') + (I'^2))$. en effet (cf. p.27)

$$(I)_{0,5} = K_i\ \frac{-\delta + \sqrt{\delta^2 + 4\delta}}{2} = K_i\ \ 0,618$$

$$\boxed{K_i = 386\ mg/ml = 1,13\ M}$$

La courbe 2 de la fig. XVI n'est cependant pas une droite. δ n'est donc pas égal à 1.

- Par contre, $1/v_i = f\ (I)^2$ paraît linéaire (courbe 3 de la fig. XVI). Nous pouvons le vérifier par la méthode des moindres carrés.

Lorsqu'on peut relier deux valeurs x et y appartenant à deux ensembles X et Y, par une relation linéaire $y = ax + b$, on définit un coefficient de corrélation

$$r = \frac{\frac{1}{N} \sum xy - \bar{x}.\bar{y}}{\sigma x \quad \sigma y}$$

avec N = nombre total de couples

$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum x$

$\bar{y} = \frac{1}{N} \sum y$

σx = déviation standard telle que $\sigma x^2 = \frac{1}{N} \sum x^2 - (\bar{x})^2$

σy = déviation standard telle que $\sigma y^2 = \frac{1}{N} \sum y^2 - (\bar{y})^2$

Si $r = + 1$ (pour $a > 0$), les couples x, y sont tels que la relation $y = ax + b$ soit rigoureusement vérifiée.

Nous trouvons ici

$$\boxed{r = 0,98}$$

Nous pouvons donc penser qu'il existe une relation linéaire entre $1/v_i$ et $(I)^2$.

δ est par conséquent différent de 1 et très petit. En effet, dans ce cas

$$1/v_i = 1/v \left(1 + \frac{(I)^2}{\delta K_i^2}\right)$$

il existe une relation linéaire entre $1/v_i$ et $(I)^2$.

v_i = vitesse en présence de l'inhibiteur

v = vitesse en l'absence de l'inhibiteur

La figure XVII reproduit les mêmes expériences que celles de la figure XVI, faites cette fois-ci en présence d'α-Chymotrypsine. On voit que $1/v_i$ n'est pas proportionnel à (I) mais à $(I)^2$; nous pouvons donc penser qu'ici encore deux molécules de sucre se fixent sur une molécule de β-Lactoglobuline et que δ très faible.

- E -

$$\frac{1}{i} = 1 + \frac{1}{(I)/K_i + (I)^2/\delta K_i^2}$$

Dans le cas où $\delta = 1$

$$\frac{1}{i} = 1 + \frac{1}{(I)/K_i + (I)^2/K_i^2}$$

La figure XVIII montre que 1/i n'est linéaire ni en 1/(I) ni en $\frac{1}{(I') + (I')^2}$

Si $1/i$ est une fonction linéaire de $1/(I)^2$, on peut penser que δ est différent de 1 et très petit, ce qui veut dire que la deuxième molécule d'inhibiteur est liée plus fortement que la première.

Bien que cette représentation E ne donne pas la même dispersion que la précédente, D, la figure XVIII nous montre que $1/i$ qui n'est pas linéaire en fonction de $1/(I)$ ou $\frac{1}{(I') + (I')^2}$ parait l'être en fonction de $(I)^2$. Nous l'avons comme précédemment vérifié par la méthode des moindres carrés. Nous avons obtenu un coefficient de corrélation :

$$\boxed{r = 0,996}$$

Nous avons donc confirmation du fait que deux molécules se fixent sur la protéine et que le coefficient d'interaction est différent de 1 et très faible.

La figure XIX nous montre les mêmes expériences faites en présence d'α-Chymotrypsine. Le phénomène reste identique à celui que l'on observe avec la Trypsine. Ceci est, comme nous l'avons déjà dit, un argument en faveur de la liaison de l'inhibiteur avec le substrat.

- F -

$$\frac{(I)\ (1-i)}{i} = \frac{K_i}{1 + (I)/\delta K_i}$$

Nous avons déjà vérifié (fig. XV) que $\frac{(I)\ (1-i)}{i}$ est indépendant de (S).

Sur la figure XX nous avons tracé (courbe 1) $\frac{1-i}{i} = f$ (1/I) qui est bien une courbe du 2ème degré.

Par contre $\frac{1/(1-i)\ I}{i}$ paraît linéaire en fonction de I (courbe 2) (fig. XX).

Cette dernière représentation ne nous permet cependant pas de faire d'hypothèse sur la valeur de δ, ni de calculer K_i.

L'étude cinétique nous a donc conduit à la conclusion que le Saccharose inhibe la protéolyse trypsique de la β-Lactoglobuline A par fixation de deux molécules de Saccharose sur la protéine substrat. Cette inhibition est du type non compétitif total, la protéine n'a pas la même affinité pour les deux molécules de sucre, la deuxième étant beaucoup plus fortement liée que la première.

III_4 - <u>Nature de la liaison</u>

III_{4I}) La liaison est très rapide $\leq$ 1 seconde limitée par le temps de mélange.

En effet, quel que soit le temps de contact préalable Saccharose-Protéine, la vitesse est toujours la même.

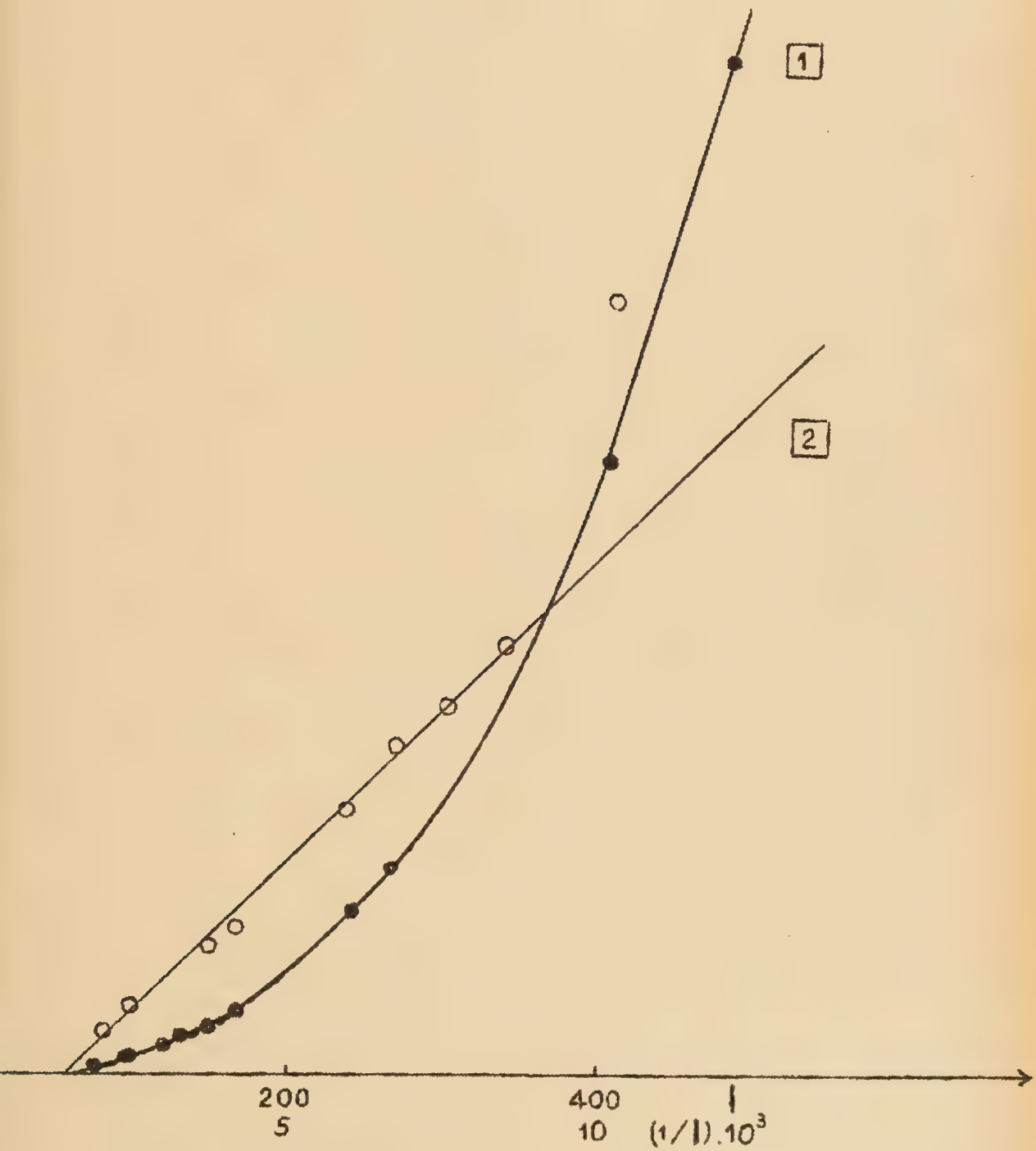
III_{42}) <u>Nombre de molécules liées par molécule de protéine</u>.

Cinétiquement, nous avons vu que deux molécules de Saccharose paraissent se fixer sur une molécule de β-Lactoglobuline. Ces deux molécules peuvent se fixer de façons différentes. Nous n'avons envisagé jusqu'ici que le cas où un seul site de fixation lierait les deux molécules. Trois autres cas peuvent se présenter.

Figure 20 - Trypsine

1= (1-i)/i en fonction de 1/I

2= i/(1-i)I " I



1) Il y a plusieurs sites de fixation indépendants mais qui ont des affinités intrinsèques différentes pour l'inhibiteur. Le schéma est alors :

(S = Substrat ; R = site de fixation)

$$SR'R'' \ldots R^n + nI \rightleftharpoons SR'IR''I \ldots R^nI$$

avec des constantes K_{i1}, K_{i2} ... pour chaque site.

2) Il y a différents sites de fixation non indépendants qui ont des affinités intrinsèques identiques pour l'inhibiteur mais qui interagissent de telle sorte que la liaison de chaque molécule d'inhibiteur influence la liaison des autres sur les sites adjacents.

$$SR_n + nI \rightleftharpoons SR_nI_n$$

avec des constantes K_i ; αK_i ; βK_i ... pour les liaisons successives.

3) La protéine possède des sites fonctionnels et d'autres non fonctionnels. Seule, une certaine fraction d'inhibiteur lié exerce une action inhibitrice. Dans ce cas, la liaison sur les groupes non fonctionnels n'a pas d'effet à moins qu'elle ne contribue à la réduction de la concentration d'inhibiteur libre.

(B = site de fixation non fonctionnel)

$$S\begin{cases} R \\ Bn \end{cases} + (n+1)\,I \rightleftharpoons S\begin{cases} RI & \text{avec une constante } K_i \\ B_nI_n & \text{avec une constante } K_b \end{cases}$$

Le fait que deux molécules de Saccharose seulement interviennent dans la réaction enzymatique n'exclut pas, a priori la possibilité que beaucoup d'autres molécules puissent se fixer sur la molécule protéique.

Nous avons vérifié qu'il ne se lie pas plus de deux molécules en utilisant la méthode des équilibres de dialyse. Cette méthode basée sur la théorie des équilibres multiples a été étudiée systématiquement sous les deux aspects théorique et expérimental par KLOTZ dès 1946 (44)

Principe de la méthode

La solution contenant la macromolécule P est séparée par une membrane semi-perméable (de collodion dans nos expériences, car l'équilibre s'établit beaucoup plus rapidement qu'avec une membrane de cellophane), d'une autre solution contenant seulement le solvant (eau) et d'autres petites molécules ou ions (Saccharose (A) et sels du tampon) qui peuvent passer à travers la membrane. Les deux solutions sont agitées et restent en contact à température constante jusqu'à ce que l'analyse montre que l'équilibre est atteint ; on mesure alors la concentration totale de A à l'extérieur de la membrane. Puisque l'on peut admettre qu'à l'équilibre la concentration de la petite molécule à l'état libre est la même de chaque côté de la membrane, connaissant le nombre total des petites molécules, les volumes, à l'intérieur et à l'extérieur du sac de collodion, et le nombre de molécules de protéine, nous pouvons par un calcul simple connaître le nombre de petites molécules liées par molécule de protéine.

Il est nécessaire de faire une correction qui corresponde aux molécules liées à la membrane. La meilleure façon de procéder est d'employer des poids connus de membrane car ainsi que le font remarquer STEINHARDT et BEYCHOK (45), il est évident que dans des contrôles faits sans protéine à l'intérieur du sac, la concentration de la molécule libre à l'équilibre ne peut avoir la même valeur qu'en présence de protéine, si celle-ci

lie justement la première molécule. Encore faut-il que la méthode de mesure de cette concentration soit suffisamment fine pour que les variations de concentration dûes à la liaison ne soient pas du même ordre de grandeur que les erreurs d'expérience.

Résultats

Nous avons vu que l'inhibition n'apparaît que lorsque la concentration de la protéine est mille fois plus faible que celle de l'inhibiteur. Il y a donc peu de chance pour que, dans les conditions où on l'observe, l'on puisse déceler les différences dûes à la liaison avec la protéine même avec un appareil très sensible. Cependant, si n était très grand, de l'ordre de 10^2, nous pourrions peut-être observer une fixation, mais nous serions encore très près des limites de l'erreur.

L'expérience préliminaire d'équilibre a été faite à + 4°C avec 2,09 ml de volume intérieur d'une solution dans le tampon phosphate de Kirkwood (PO_4H_2K = 7,04 g/l
(PO_4HNa_2, $12H_2O$ = 14,4 g/l
à pH = 7, μ = 0,171 contenant 62,06 mg de β-Lactoglobuline A et 5 ml de volume extérieur de Saccharose M dans le même tampon.

L'agitation est faite à l'aide d'un agitateur magnétique. Les temps d'équilibration sont 1, 2, 3 et 4 heures.

La méthode de dosage du Saccharose est la mesure du pouvoir rotatoire au polarimètre QUICK-JOUAN utilisé à la longueur d'onde λ = 589 μ. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau VII.

Ils nous conduisent aux conclusions suivantes :

- l'équilibre est déjà atteint au bout d'une heure, à 4°C ;

TABLEAU VII

Pouvoir rotatoire spécifique d'une solution de Saccharose M = 6,487

Nombre de Moles de Saccharose dans le sac extérieur avant l'expérience : 5.10^{-3}

Temps d'équilibration	Nombre de Moles de Saccharose intérieur + extérieur en fin d'expérience calculées d'après le dosage polarimétrique du Saccharose à l'intérieur du sac
1 heure	$4,92.10^{-3}$
2 heures	$5,07.10^{-3}$
3 heures	$5,10.10^{-3}$
4 heures	$5,08.10^{-3}$

- Si nous prenons la moyenne des quatre expériences, l'erreur est de 1 %.

- Il n'y a aucune liaison décelable, mais les conditions choisies n'étaient pas bonnes. En effet, nous sommes limités par trois impératifs :

1- la solubilité de β-Lactoglobuline ;

2- la limite inférieure de sensibilité du polarimètre qui ne nous permet pas de descendre au-dessous d'une concentration en Saccharose de 2.10^{-3} M.

3- les concentrations relatives de sucre et de protéine qui doivent être choisies de telle sorte que les variations de concentration en Saccharose dues à la fixation de celui-ci sur la protéine soient suffisamment grandes pour qu'on puisse les mesurer par différence entre les concentrations initiale et finale.

Pour que le phénomène soit décelable, il faut donc que la concentration en Saccharose soit comprise entre 2.10^{-3}M et 10^{-1} M et que la concentration en protéine soit maximum, c'est-à-dire d'environ 100 mg/ml. Dans ces conditions, nous pouvons observer une fixation de Saccharose allant de 1 à 10 molécules par molécule de β-Lactoglobuline.

Il ne faut cependant pas manquer de noter que la concentration en protéine que nous sommes obligés d'utiliser est de 10 % environ, ce qui est loin des conditions préconisées par KLOTZ (0,1 %).

La représentation de KLOTZ soit 1/r (r = nombre de molécules de Saccharose liées par molécule de β-Lactoglobuline) en fonction de 1/(A) ((A) = concentration en Saccharose) donne une droite dans le cas où il n'y a pas d'interaction.

La pente est alors 1/rk et 1/r l'ordonnée à l'origine.

Nous pouvons donc atteindre le nombre maximum r de molécules liées à la macromolécule et la constante intrinsèque d'association.

Les résultats du Tableau VIII nous montrent que seule une molécule de Saccharose semble se fixer par molécule de β-Lactoglobuline pour des concentrations en sucre $< 10^{-1}$ M. Nous pouvons par contre affirmer qu'il ne s'en fixe pas plus d'une, dans les conditions de l'expérience, c'est-à-dire pour une concentration en Saccharose $\leq 2.10^{-2}$ M.

Nous avons montré que la fixation de la deuxième molécule n'est pas indépendante de la première. Nous sommes donc conduit à penser qu'il y a deux sites de fixation homologues et que nous sommes en présence d'un phénomène d'allostérie.

Nous pouvons traduire les cinétiques d'inhibition dans les coordonnées de HILL.

L'extension de cette représentation à l'analyse des courbes d'inhibition par le Saccharose se justifie dans les conditions suivantes (46) :

1- L'hypothèse de BRIGGS-HALDANE est vérifiée, c'est en effet le cas ici : il y a un état stationnaire du complexe E.S.

2- La présence de Saccharose modifie uniquement la fraction des molécules sous forme de complexe actif. C'est aussi ce que nous avons supposé en disant que l'inhibition est totale.

Nous avons alors utilisé les coordonnées de HILL de la façon suivante :

en ordonnée $\log \frac{v - v_i}{v_i}$ et en abscisse $- \log I$

TABLEAU VIII

n	n'	n"	r	A
$4,9.10^{-5}$	$3,46.10^{-5}$	$1,44.10^{-5}$	1	$5 .10^{-3}$ M
$9,8.10^{-5}$	$8,70.10^{-5}$	$1,44.10^{-5}$	0,8	10^{-2} M
$1,2.10^{-4}$	$1,17.10^{-4}$	$1,34.10^{-5}$	0,4	$1,2.10^{-2}$ M
$2,02.10^{-4}$	$1,91.10^{-4}$	$1,34.10^{-5}$	0,8	$2 .10^{-2}$ M

A = concentration en Saccharose

n = nombre total de molécules de Saccharose libres avant la dialyse.

n' = nombre total de molécules de Saccharose libres après la dialyse.

n" = nombre total de molécules de β-Lactoglobuline

pH = 7 température = 4°C

$r = \frac{n - n'}{n''}$ = nombre de molécules de Saccharose liées à une molécule de β-Lactoglobuline.

v = vitesse de la réaction enzymatique en l'absence d'inhibiteur ;

v_i = vitesse de la réaction enzymatique en présence d'inhibiteur ;

I = concentration en Saccharose.

Les résultats des expériences de la figure XII sont portés sur la figure XXI. Dans la partie moyenne, et largement autour d'elle, les points s'alignent très convenablement et la pente ainsi déterminée est égale à - 2,7.

Il y a par conséquent plusieurs récepteurs spécifiques du Saccharose sur la β-Lactoglobuline entre lesquels il existent des interactions de stabilisation (n = 2,7).

Si nous sommes en présence d'un phénomène d'allostérie, selon MONOD, WYMAN et CHANGEUX (6), nous devons observer un effet homotrope, il doit donc être coopératif : en effet, la liaison de la 2ème molécule de Saccharose augmente l'inhibition déjà observée avec la 1ère. D'autre part, les interactions allostériques apparaissent en général comme liées à des altérations de la structure quaternaires des protéines, c'est-à-dire des liaisons entre les sous-unités ou protomères.

"A chaque "ligand" capable de former un complexe stéréospécifique avec la protéine, correspond un et un seul site sur chaque protomère" (6)

Bien que pas toujours admis à l'heure actuelle, ceci est tout à fait compatible avec la structure quaternaire de la β-Lactoglobuline qui, à pH = 7 et 35°C, est à 70-75 % sous forme de dimère (47,29).

La molécule qui possède des propriétés allostériques peut exister sous deux formes différentes.

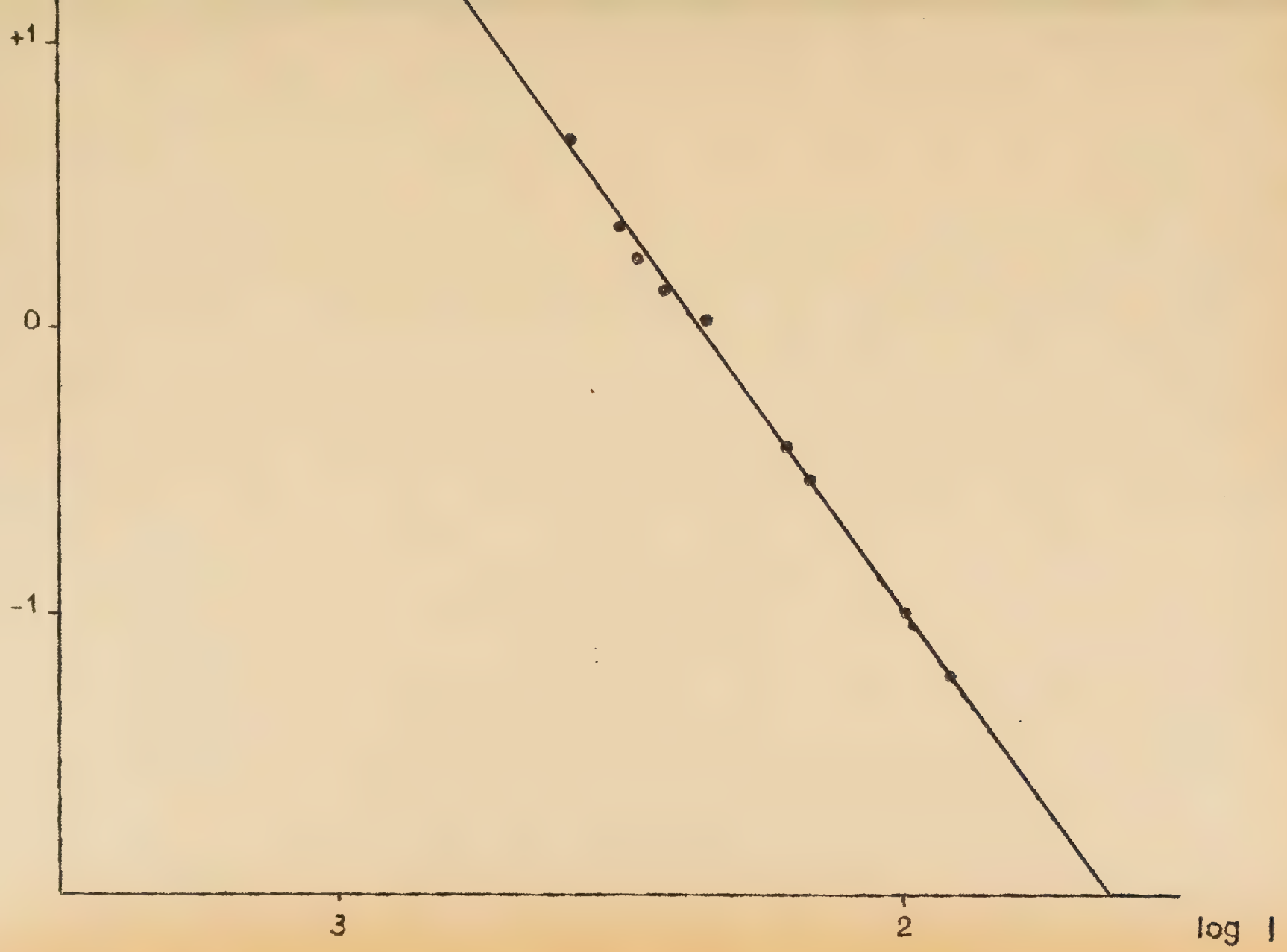


fig. 21

Nous pensons avoir pu mettre en évidence un changement de structure directement lié à la concentration en Saccharose du milieu.

Nous avons étudié les spectres ultraviolets différentiels de β-Lactoglobuline avec ou sans Saccharose, selon la méthode de perturbation dûe au solvant (décrite par HERSKOVITS (48, 49). Cette méthode destinée à explorer la surface des molécules protéiques est basée sur le fait que le spectre des chromophores qui entrent librement en contact avec le solvant, est sensible aux variations des propriétés physiques du solvant (indice de réfraction, constante diélectrique, interaction solvant - soluté) au voisinage immédiat de ces chromophores.

Nous avons donc pensé que si des concentrations croissantes en Saccharose amenaient un changement de structure dans la β-Lactoglobuline, nous pourrions observer un accident dans la courbe de perturbation dûe au solvant par rapport à celle d'un modèle qui contient les chromophores Tyrosine et Tryptophane dans les mêmes proportions que dans la molécule de β-Lactoglobuline. La variation relative des spectres de β-Lactoglobuline et du modèle nous montrerait le "masquage" ou le "démasquage" d'un ou de plusieurs chromophores forcément lié à un changement de structure.

C'est en effet ce que nous montre la figure XXIII

Les mesures ont été faites à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 14.

Le "modèle" a été préparé à partir de N-Acétyl-Tyrosine (Calbiochem A grade) et N-Acétyl Tryptophane-Ethyl-Ester (Mann Research Lab. (M/P. = 109°C), à raison de 8 Tyrosine et 4 Tryptophane par molécule de Lactoglobuline de P.M. 36.000 (50).

Les solutions sont telles que soit pour le modèle, soit pour la protéine, la densité optique des solutions dans ClNa 0,1 M à λ = 278-280 mμ, soit d'environ 1,3.

Le pH est de 7, la force ionique 0,1, la température 20°C. Les concentrations en Saccharose sont de 0,1 à 1,5 M.

En raison de la faible solubilité des acides aminés, nous n'avons pu dépasser 1 M en Saccharose pour l'étude de l'effet de perturbation du solvant sur les chromophores du modèle.

Pour éviter les erreurs de volume dûes à la viscosité des solutions de Saccharose, nous avons préféré aux pipettes des seringues de type B.D. CORNWALL. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau IX et les figures XXII et XXIII.

Nous y avons exprimé $\Delta\varepsilon/\varepsilon$ et R_M

$\Delta\varepsilon$ = différence des coefficients d'absorption molaire à λ = 291 - 293 mμ

ε = coefficient d'absorption molaire à = 278 - 280 mμ de la protéine ou du mélange seuls

$\Delta\varepsilon/\varepsilon$ = a l'avantage d'être égal à $\frac{\Delta Do}{Do}$

Do = densité optique

Ce que nous avons appelé R_M est le rapport des valeurs de $\Delta\varepsilon/\varepsilon$ pour la β-Lactoglobuline à celles observées avec le mélange d'acides aminés.

On peut admettre que l'erreur commise sur $\Delta\varepsilon/\varepsilon$ et R_M est de 5 à 7 %. (49)

TABLEAU IX

β-Lactoglobuline A / Saccharose	$\Delta\varepsilon$ 291-293/ ε 278-280		R_M
	Protéine	Modèle	
Saccharose 0,1 M	0	0,001	
" 0,3 M	0,005	0,011	0,45
" 0,5 M	0,010	0,022	0,45
" 0,8 M	0,025	0,039	0,64
" 1 M	0,031	0,05I	0,61
" 1,2 M	0,036		
" 1,5 M	0,044		

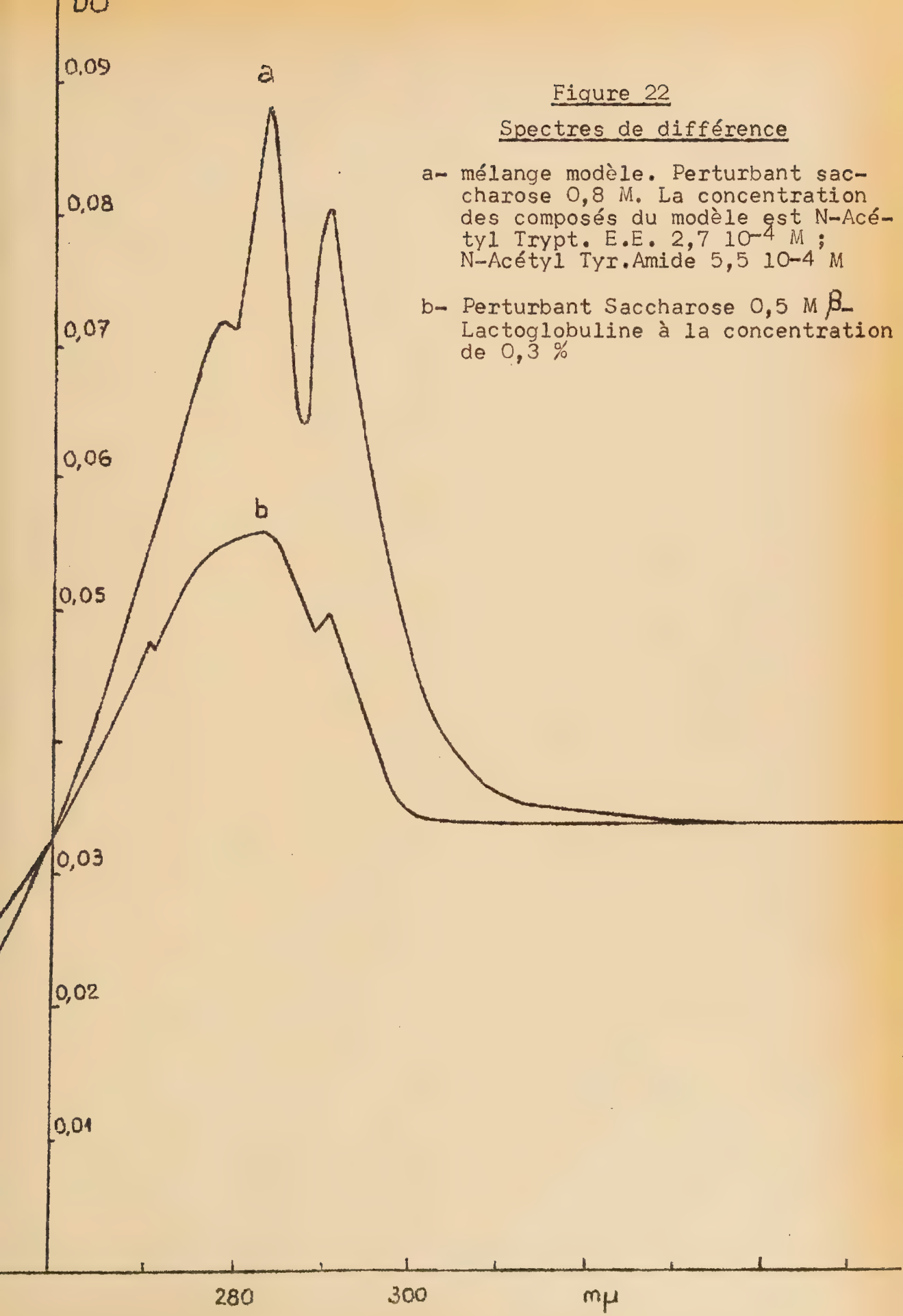


Figure 22

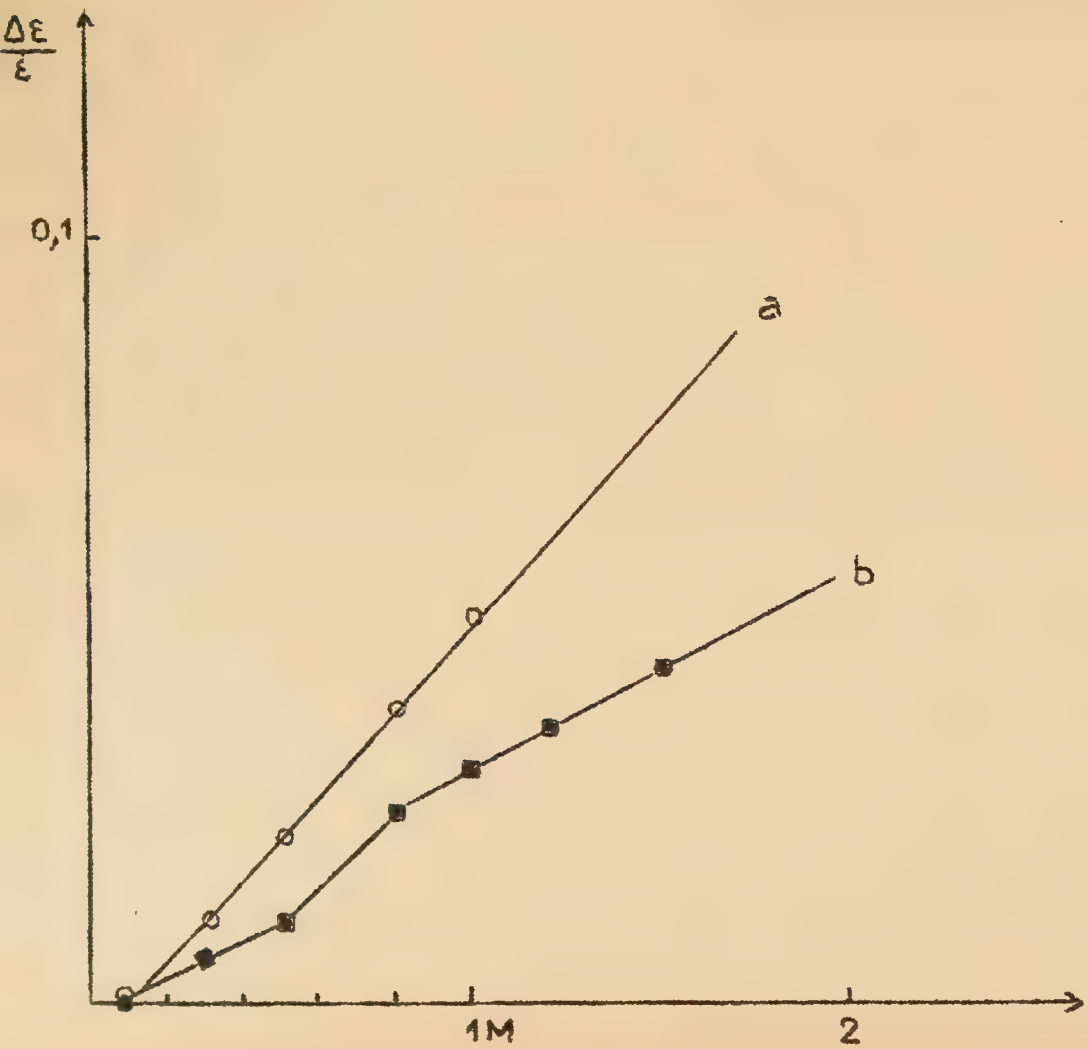
Spectres de différence

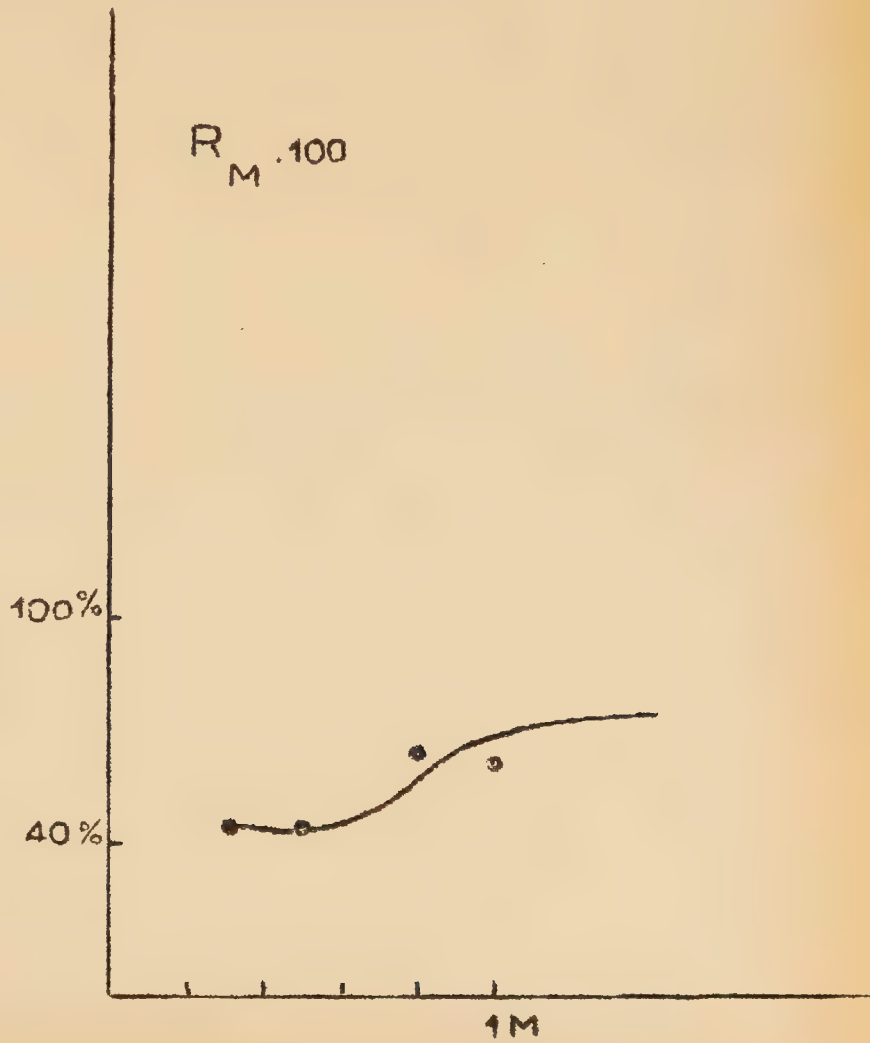
a- mélange modèle. Perturbant saccharose 0,8 M. La concentration des composés du modèle est N-Acétyl Trypt. E.E. 2,7 10^{-4} M ; N-Acétyl Tyr.Amide 5,5 10^{-4} M

b- Perturbant Saccharose 0,5 M β-Lactoglobuline à la concentration de 0,3 %

a- mélange d'acides amines modèle identique à celui de la fig.22

b- β Lactoglobuline à la concentration de 0,3 %





La figure XXII représente les spectres différentiels obtenus.

Nous avons fait les mesures à la longueur d'onde λ = 290-292 mu qui représente l'absorption maximum dûe au Tryptophane.

En effet, pour un rapport Tryptophane/Tryptophane + Tyrosine de 0,5, le Tryptophane contribue au spectre de la Tyrosine de façon telle qu'il n'est pas possible de savoir à la longueur d'onde du maximum d'absorption de la Tyrosine dans les spectres différentiels, ce qui revient à l'un ou à l'autre de ces acides aminés.

La figure XXIII nous montre que la perturbation dûe au solvant qui est directement proportionnelle à la concentration du solvant pour le modèle, l'est aussi pour la β-Lactoglobuline aux faibles valeurs et aux fortes valeurs mais qu'entre 0,5 et 1,2 M de Saccharose une molécule de Tryptophane est venue en contact avec le solvant totalement ou en partie (R_M varie de 45 % à 65 %).

Nous n'obtenons pas la même valeur de R_M pour la protéine en solution dans l'eau que celle trouvée par HERSKOVITS 0,45 au lieu de 0,25 à 0,30.

Ceci provient de ce que nous n'avons pas utilisé tout à fait la même technique : nous avons pris directement le Saccharose comme perturbant, ce qui rend évidemment les spectres ~~très petits~~ de différences dûs aux faibles concentrations en Saccharose et l'erreur commise sur leur mesure beaucoup plus grande. De plus, HERSKOVITS ne précise pas s'il s'agit de β-Lactoglobuline A ou β. D'autre part, nous n'avons pas de Phényl-Alanine dans le modèle.

Nous pensons que ce changement de structure de la β-Lactoglobuline observé en présence de Saccharose est responsable de l'inhibition de la protéolyse trypsique de la β-Lactoglobuline A par le Saccharose, la liaison des deux molécules de Saccharose sur la β-Lactoglobuline, se faisant sur un site du protomère dans le dimère.

La β-Lactoglobuline serait donc une protéine ayant des propriétés allostériques et le Saccharose qui possède des affinités différentes pour les deux formes structurales de la protéine, agit comme un effecteur allostérique. Nous n'avons pu faire de mesure de pouvoir rotatoire de la β-Lactoglobuline en présence de Saccharose. En effet le pouvoir rotatoire propre du sucre rend les mesures impossibles.

III$_{43}$- La liaison est-elle polaire ?

Nous avons effectué des courbes de titrage de la protéine substrat en absence et en présence de sucre à différentes concentrations de l'une et de l'autre, en solution dans NaCl pour une force ionique de 0,1. Les calculs ont été faits selon CANNAN (51), en prenant pour poids moléculaire de la protéine 40 000, ce qui nous a permis de comparer nos courbes aux siennes et ce qui entraîne une légère translation de la courbe, sans inconvénient s'il ne s'agit tout d'abord que d'observer un changement relatif.

Les courbes expriment $\bar{Z}$ la charge nette en fonction du pH, en supposant que ni Cl^- ni Na^+ ne se lient à la protéine. Or, si ceci est vrai pour Na^+ pour la force ionique considérée, ce ne l'est plus tout à fait pour Cl^-. La correction en résultant est faible. Nous n'en avons pas tenu compte ne sachant pas qu'elle aurait été la correction en présence de Saccharose.

Les courbes témoins sont identiques à celles de CANNAN pour la même force ionique (Fig. XXIV). Celles qui correspondent au titrage en présence de Saccharose sont corrigées à l'aide des courbes de titrage du Saccharose seul (Fig. XXV). Celles-ci montrent que le Saccharose peut être assimilé à un diacide faible dont les pK seraient :

$$pK_1 < 3$$

$$pK_2 > 9,5$$

Toutes les courbes de titrage en présence de Saccharose présentent les mêmes anomalies (Fig. XXVI), qui sont d'autant plus importantes que la concentration en Saccharose et le rapport (P)/(I) (concentration en protéine sur concentration en inhibiteur), est plus grand.

Nous comparerons les courbes 1 et 2 de la figure XXVI qui ont été faites pour un rapport (P)/(I) constant, à la courbe témoin XXIV.

La courbe de titrage de β-Lactoglobuline seule est réversible entre les pH que nous avons utilisés, c'est-à-dire entre 3 et 9,7. On observe cependant sur la courbe de la fig. XXIV un léger décalage entre pH 8 et 5 de la courbe de titrage "retour" sur la courbe de titrage "aller". Il se produit en fin de titrage lorsque les volumes de base et d'acide ajoutés sont maximum. Or, nous n'avons pas fait la correction qui consiste à ajuster la quantité de NaCl ajouté de façon que (HCl + NaCl) ou (NaOH + NaCl) reste constant. L'irréversibilité n'est probablement pas dûe cependant à une variation de la force ionique car celle-ci est trop faible. Les incidences de la force ionique sur la courbe de titrage deviennent d'ailleurs de plus en plus faibles au fur et à mesure que la force ionique est plus

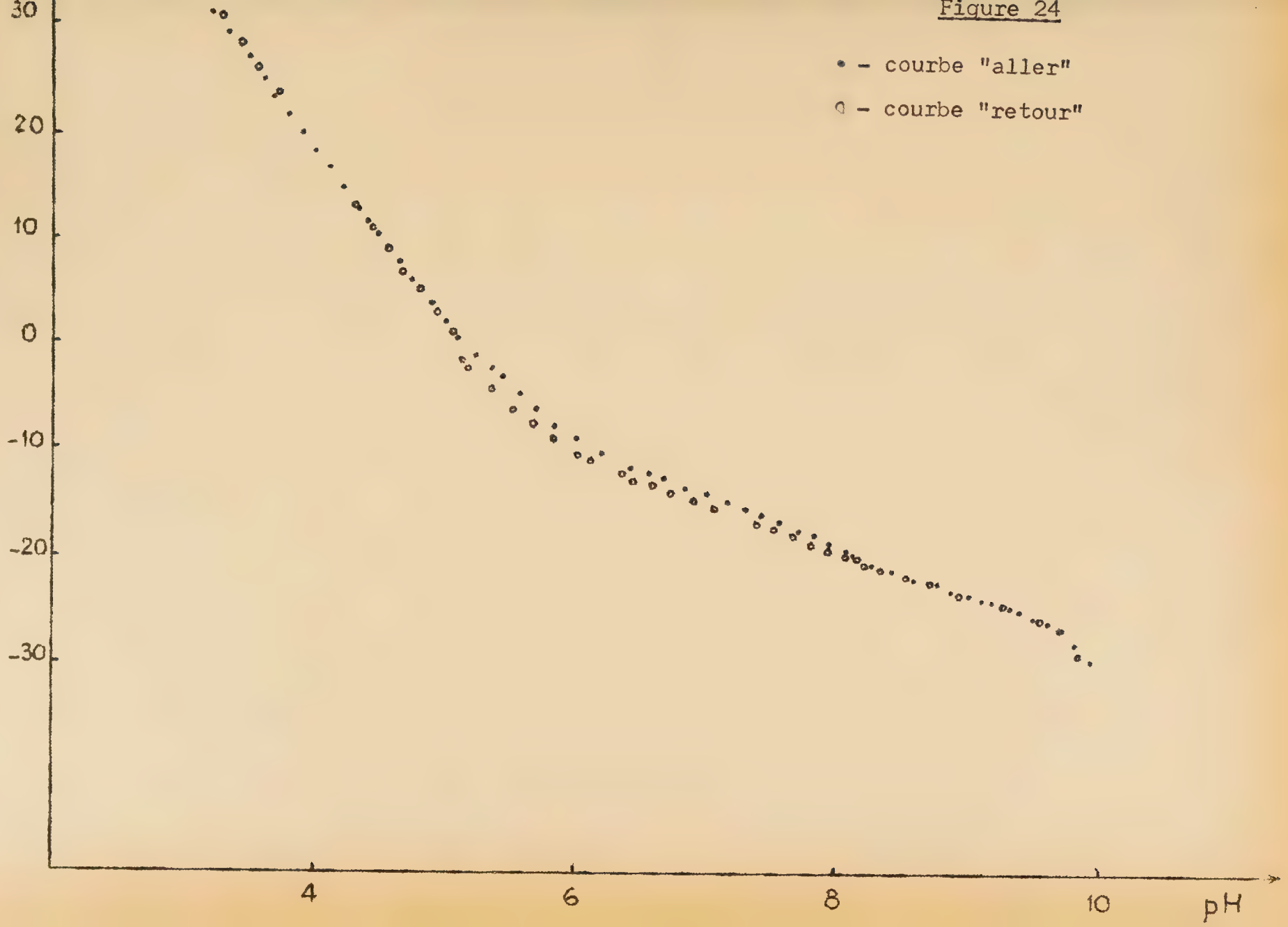


Figure 24

forte. En effet, au-dessus de $\mu = 0,1$, la valeur de w devient très petite (de l'ordre de 0,025) et le terme électrostatique devient négligeable pour toutes les valeurs de Z sauf les très fortes valeurs. Il s'agirait donc plutôt d'une légère dénaturation irréversible au cours du temps observé par TANFORD à partir de pH = 9,7 ; ou d'une erreur introduite par le fait que nous avons employé NaCl au lieu de KCl, ce qui a pu entraîner une réponse erronée de l'électrode de verre.

La fig. XXIV présente les trois régions classiques :

1- Une région de $pK_{int} = 4,6$ dans laquelle ne sont titrés que les carboxyles dont le nombre total est 52 pour une molécule de PM = 35.000. Les trois α-COOH n'apparaissent pas séparés des autres ;

2- Une région centrale faiblement tamponnée dans laquelle sont titrés les deux carboxyles anormaux de $pK_{int} = 7,3$, les α-NH_2 et les groupes imidazoles ($pK_{int} = 7,3$). La molécule subit un changement de conformation autour de pH = 7,5, qui est lié à l'ionisation des carboxyles anormaux ;

3- Une région alcaline de $pK_{int} = 9,95$ qui correspond aux groupes ε-NH_2 et aux phénols. Les groupes guanidiques dont le pK est aux environs de 12 ne sont pas titrés sur nos courbes.

Les anomalies observées sur les courbes de la fig. XXVI ne sont dûes ni à des modifications de force ionique, ni à un changement de constante diélectrique. En effet, il n'y a pas de variation de force ionique dûe au Saccharose car les volumes de base ou d'acide ajoutés sont tout à fait du même ordre de grandeur en présence ou en absence de Saccharose. La variation de constante diélectrique a peu d'effet sur la dissociation des cations (car l'ionisation d'un ammonium ne créé pas de nouvelles charges puisqu'il se forme un ion H_3O^+ par ion

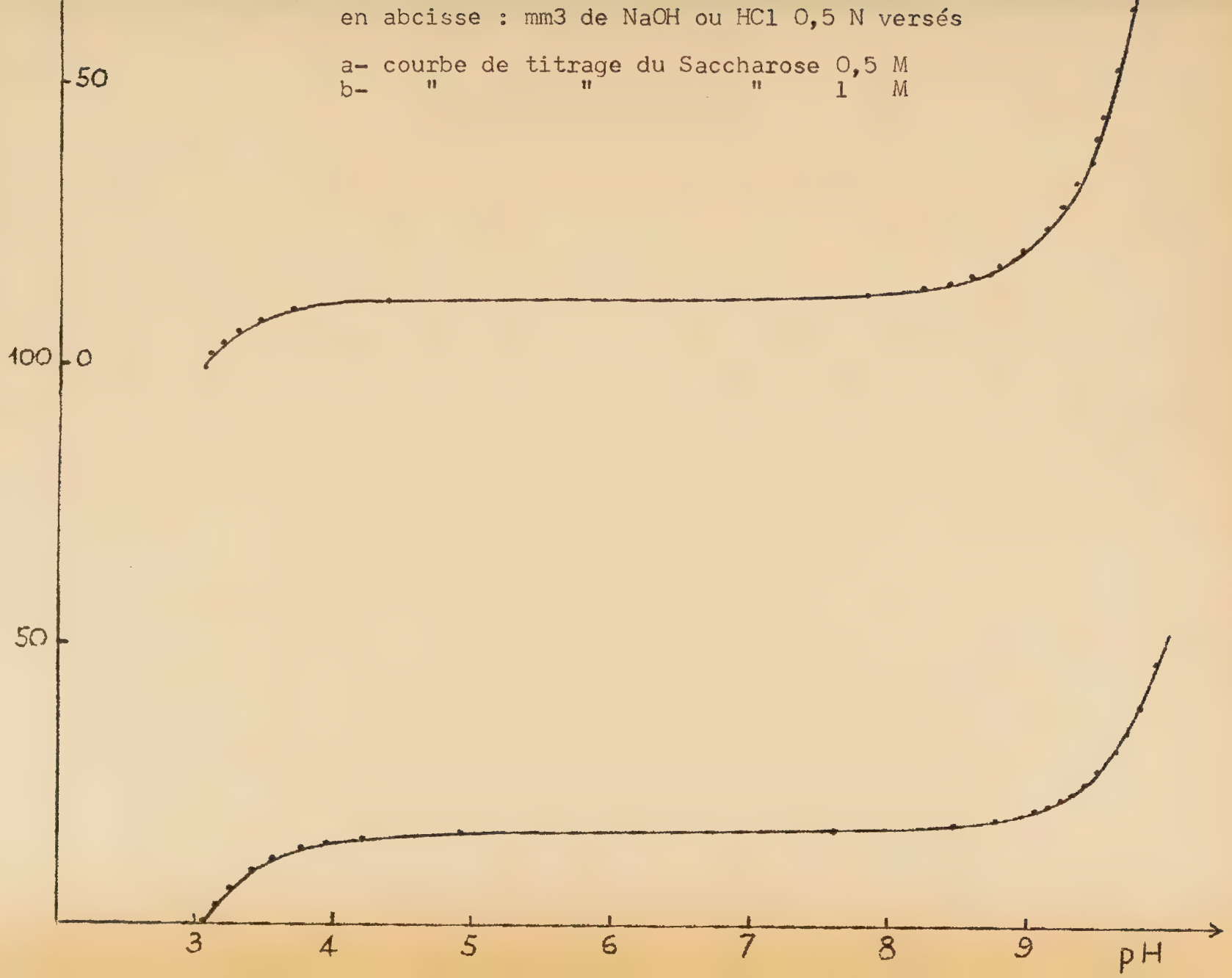
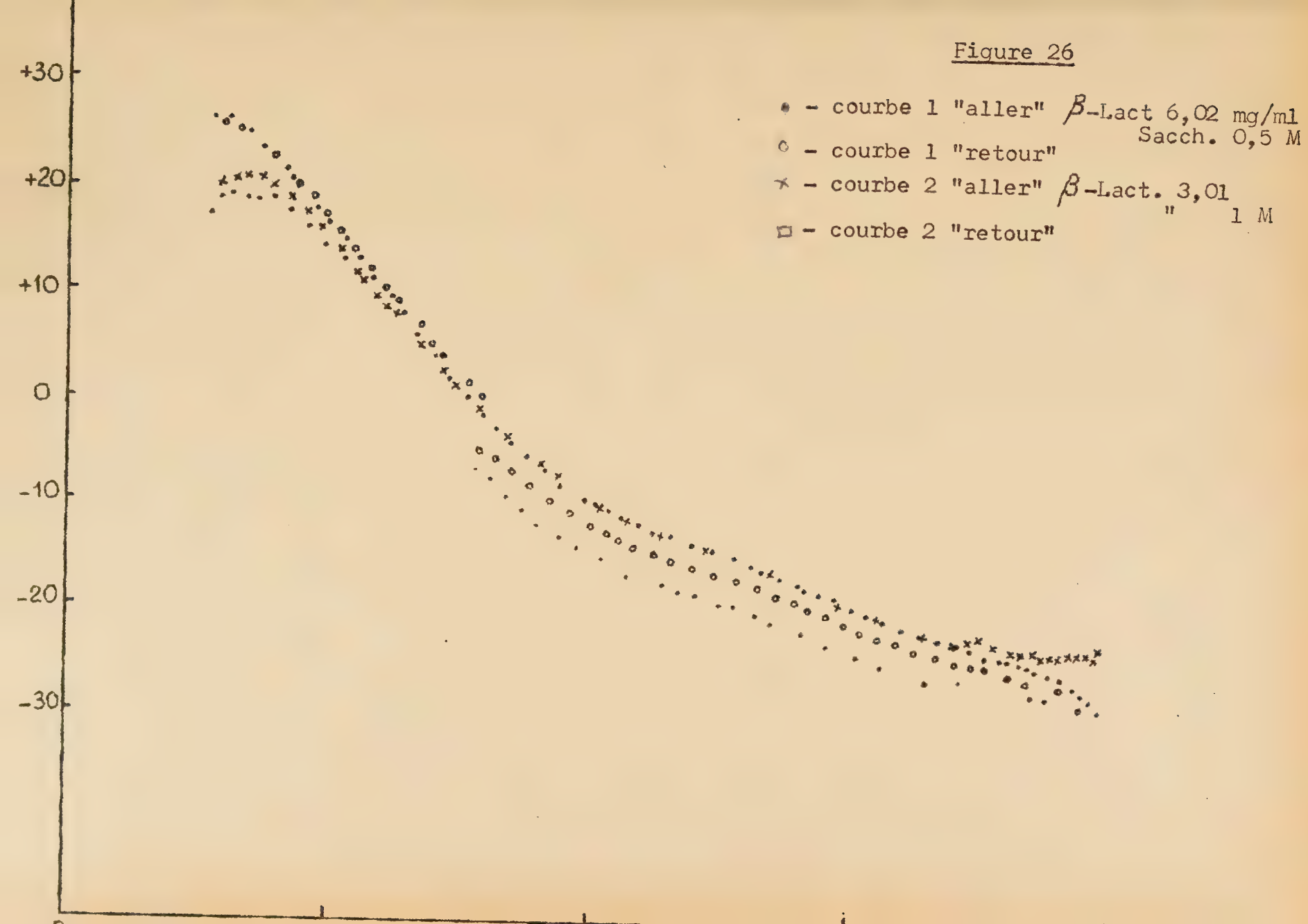

en abcisse : mm3 de NaOH ou HCl 0,5 N versés
a- courbe de titrage du Saccharose 0,5 M
b- " " " 1 M
50
100
0
50
3
4
5
6
7
8
9
pH

Figure 26


• - courbe 1 "aller" β-Lact 6,02 mg/ml
Sacch. 0,5 M
○ - courbe 1 "retour"
× - courbe 2 "aller" β-Lact. 3,01
" 1 M
□ - courbe 2 "retour"
+30
+20
+10
0
-10
-20
-30

NH_3^+ qui se décharge), mais elle réduit la tendance à la dissociation de tous les autres groupes. L'échelle de pH est diminuée dans son ensemble. Pour une variation de D de 80 à 18, on peut observer théoriquement une variation de pK de 4 à 5 unités. Les courbes ne sont pas modifiées dans ce sens (en particulier pas de modification du pK des COOH). De plus, la variation de constante diélectrique dûe au Saccharose est faible et $\Delta D \leqslant 20$.

D'une façon générale, les anomalies des courbes de titrage peuvent être classées en :

1- Valeurs anormales de pK_{int} pour chaque type de groupe

2- Valeurs anormales du nombre de sites de chaque groupe (n_i)

3- Valeurs anormales de w.

Nos courbes présentent des anomalies dans la partie acide, dans la partie alcaline et dans la courbe de "retour". Entre pH 6 et pH 9 elles sont identiques en présence et en absence de Saccharose.

RESULTATS DE L'ETUDE AUX PH ACIDES DE LA COURBE DE TITRAGE.

On peut attribuer la forme des courbes 1 et 2, fig. XXVI, entre pH 3 et pH 6, à deux sortes de phénomènes : un "masquage" du nombre de COOH par liaison avec le Saccharose ou par changement de conformation. Il n'y a en effet pas de variation du pK_{int}.

Au maximum, à pH 3, le nombre de COOH masqués atteindrait 15 par molécule.

a) Le masquage peut se faire par formation de liaison hydrogène entre les carboxyles non chargés de la protéine et les oxhydryles du sucre. Le Saccharose, sucre non réducteur, ne possède que des oxhydryles d'alcool primaire ou secondaire (Fig. XXVII)

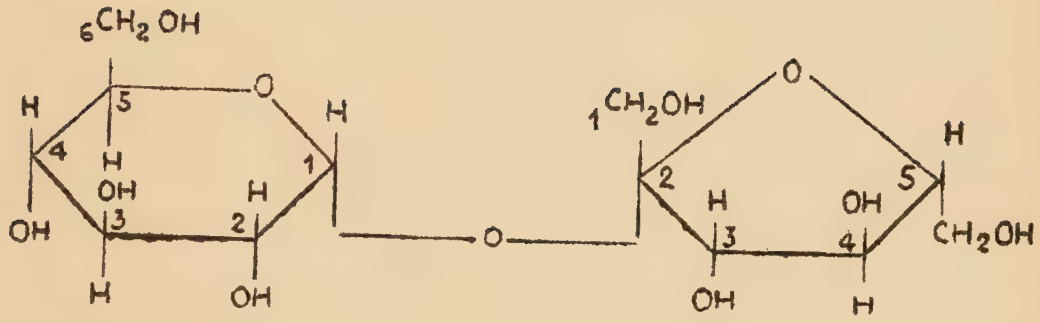


Figure 27

SACCHAROSE

α-D- Glucopyranosyl (1 → 2) β-D-Furctofuranoside

Cette hypothèse peut être étayée par le travail de LASKOWSKI et SHERAGA (52) qui ont décrit les effets de différentes sortes de liaisons hydrogènes des chaînes latérales des protéines pour expliquer les déviations observées sur les courbes de titrage. Dans ce type de liaison, on envisage un donneur de proton et un accepteur. Dans le cas de liaisons hétérologues que nous envisageons ici, le donneur et l'accepteur ont des constantes de dissociation suffisamment différentes pour que l'accepteur (Saccharose de pK 9,5) soit complètement ionisé pendant toute la période de titrage du donneur (carboxyle de pK = 4,6). La liaison ne peut plus se former quand le donneur a perdu son proton.

b) Il peut y avoir un masquage par changement de conformation. Ceci peut être vérifié en étudiant la variation du facteur électrostatique w ; en effet, dans l'expression de ce dernier entre un terme exprimant le rayon de la protéine supposée sphérique. Si la protéine subit un changement de volume par exemple par expansion, le facteur w en est immédiatement affecté et diminué.

En posant $\alpha = \bar{r}_i/n_i$ ($\bar{r}_i$ = nombre moyen de protons dissociés correspondant aux n_i sites identiques choisis), on obtient l'expression classique

$$\log \frac{\alpha}{1-\alpha} - pH = pK_{int} - 0{,}868\, w\, \bar{Z}$$

La pente de la droite $\log \alpha/(1-\alpha) = f(\bar{Z})$ donne w. Tant que la courbe reste linéaire, on peut penser que le modèle de LINDERSTROM-LANG représente bien la molécule de protéine. La fig. XXVIII représente les résultats obtenus pour le titrage des carboxyles dans les expériences des fig. XXIV et XXVI.

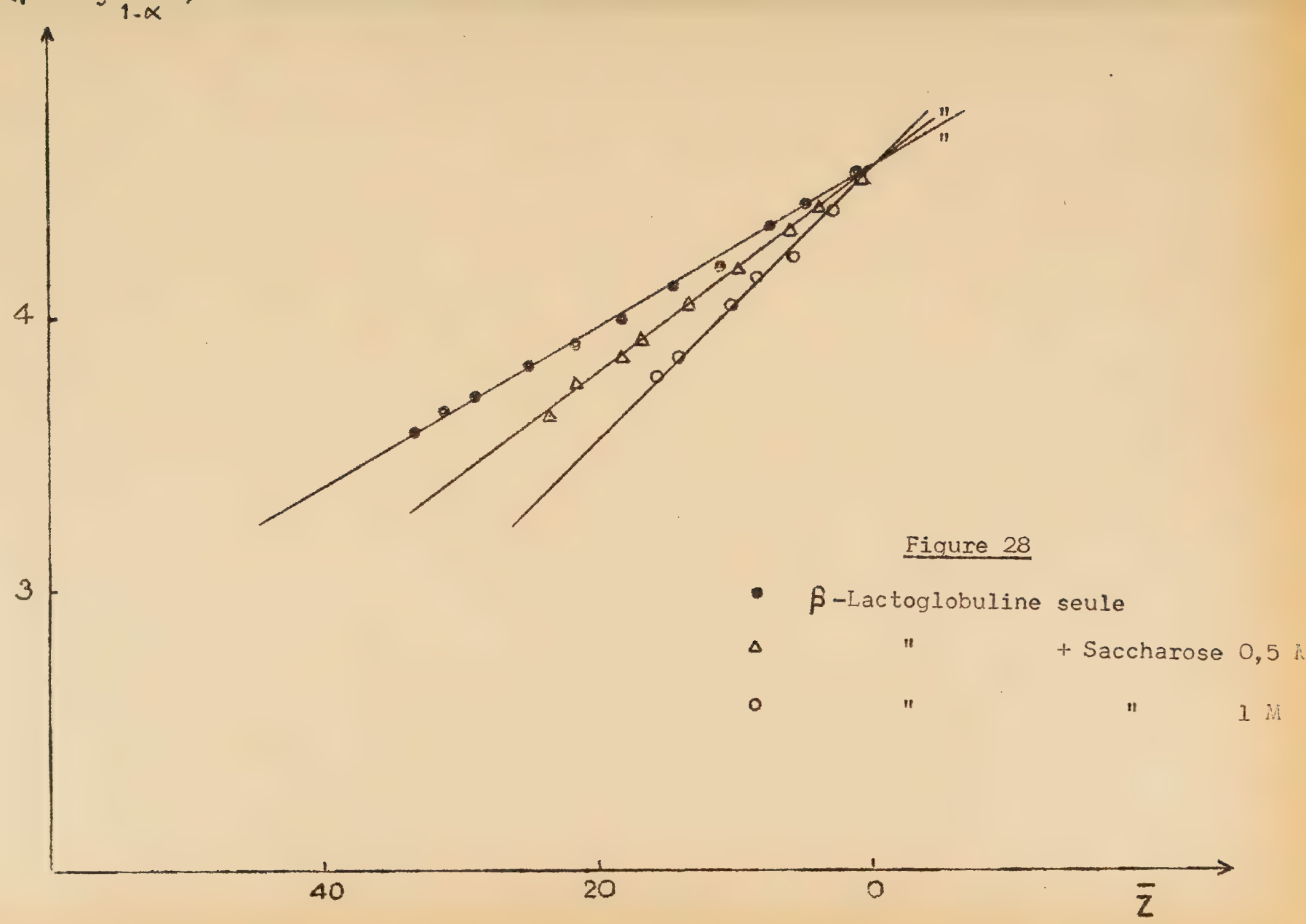


Figure 28

Ces courbes restent des droites même en présence de Saccharose. Elles correspondent à des valeurs croissantes de w données dans le Tableau X. Ces valeurs de w semblent être en rapport avec une structure plus compacte de la molécule protéique qui entraînerait une diminution de son rayon, ou un masquage des groupes.

RESULTATS DE L'ETUDE AUX PH NEUTRES ET AUX PH ALCALINS

Les courbes ne présentent aucune anomalie entre pH 6 et pH 9. Au-delà, nous savons que la β-Lactoglobuline subit un commencement de dénaturation. C'est pourquoi les courbes ne sont pas réversibles.

Il semble que la présence de sucre rende la molécule plus sensible à cette dénaturation car le décalage de la courbe de "retour" est d'autant plus important que la concentration en Saccharose est plus grande pour une concentration en protéine plus petite.

On pouvait penser qu'il se forme des liaisons hydrogène entre les OH phénoliques de la Tyrosine et ceux du sucre. Cependant, les molécules de sucre ne se fixent pas sur des groupes cationiques non chargés ; en effet, s'il en était autrement l'étude théorique montre que la courbe de titrage des carboxyles en présence de sucre serait parallèle à la courbe témoin de β-Lactoglobuline sans sucre, mais décalée : la charge positive fixe créant un déplacement global de toute la courbe vers la gauche.

Nous pouvons donc penser que seuls les carboxyles sont capables de former des liaisons de type hydrogène avec des molécules de Saccharose, qu'ils sont ainsi stabilisés sous forme non chargée et que cette liaison entraine un changement

TABLEAU X

Valeurs de w correspondant au titrage des COOH. $pK_{int} = 4,58$.

β-Lactoglobuline seule	0,0346
" + Saccharose 0,5 M	0,0438
" + Saccharose 1 M	0,0581

de conformation réversible de la protéine décelable sur les courbes de titrage aux pH inférieur à pH = 6, qui correspondrait à une structure plus compacte.

Entre pH = 7 et pH = 8,5, les courbes de titrage sont absolument identiques en présence ou en absence de Saccharose, les groupes ~~des~~ imidazoles ou α-aminés ne sont donc pas perturbés par la présence de Saccharose.

III_5 - Influence du pH.

Nous avons fait des expériences de protéolyse à des pH allant de 6,5 à 8,5 en présence de deux concentrations différentes de Saccharose (0,5 et 0,8 M) par rapport à la même expérience en l'absence de Saccharose (Fig. XXIX et XXX).

Ces expériences expriment v ou log v en fonction du pH, et non log V_M (v est donné en mm^3 NaOH N/10/minute/ml pour 1 mg/ml de Trypsine).

Il n'est pas nécessaire de faire la correction de variation de α (le coefficient de dissociation des groupes NH_3^+) avec le pH puisque les courbes n'expriment v qu'en valeur relative.

L'inhibition semble légèrement plus forte lorsque le pH est plus acide (Tableau XI), peut être par suite de l'interaction avec des carboxyles à proximité de la première liaison à rompre.

III_6 - Influence de la température

Les grandeurs thermodynamiques que l'on peut déterminer par des études cinétiques à différentes températures sont liées aux constantes d'équilibre pour une température donnée par la relation :

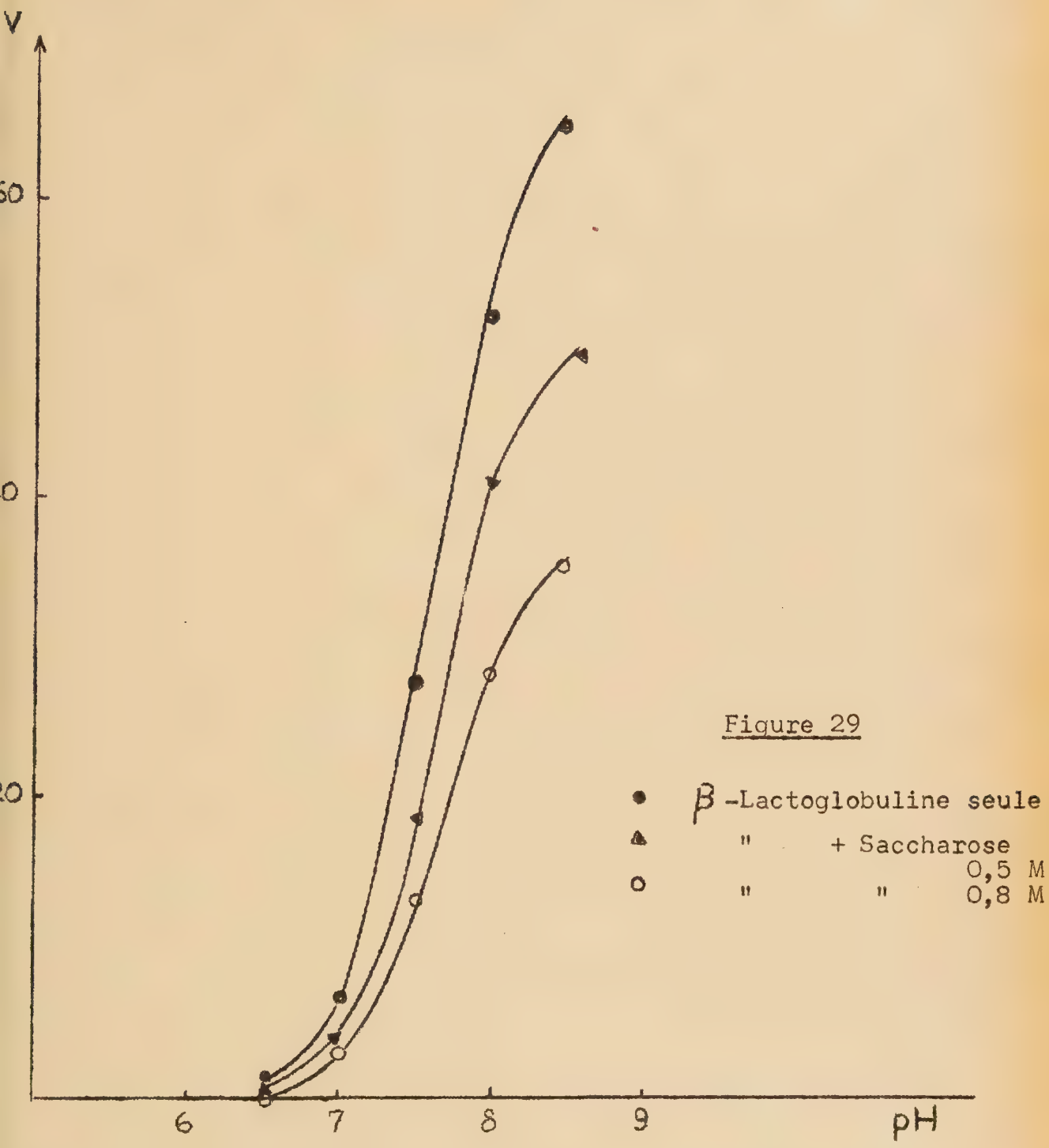


Figure 29

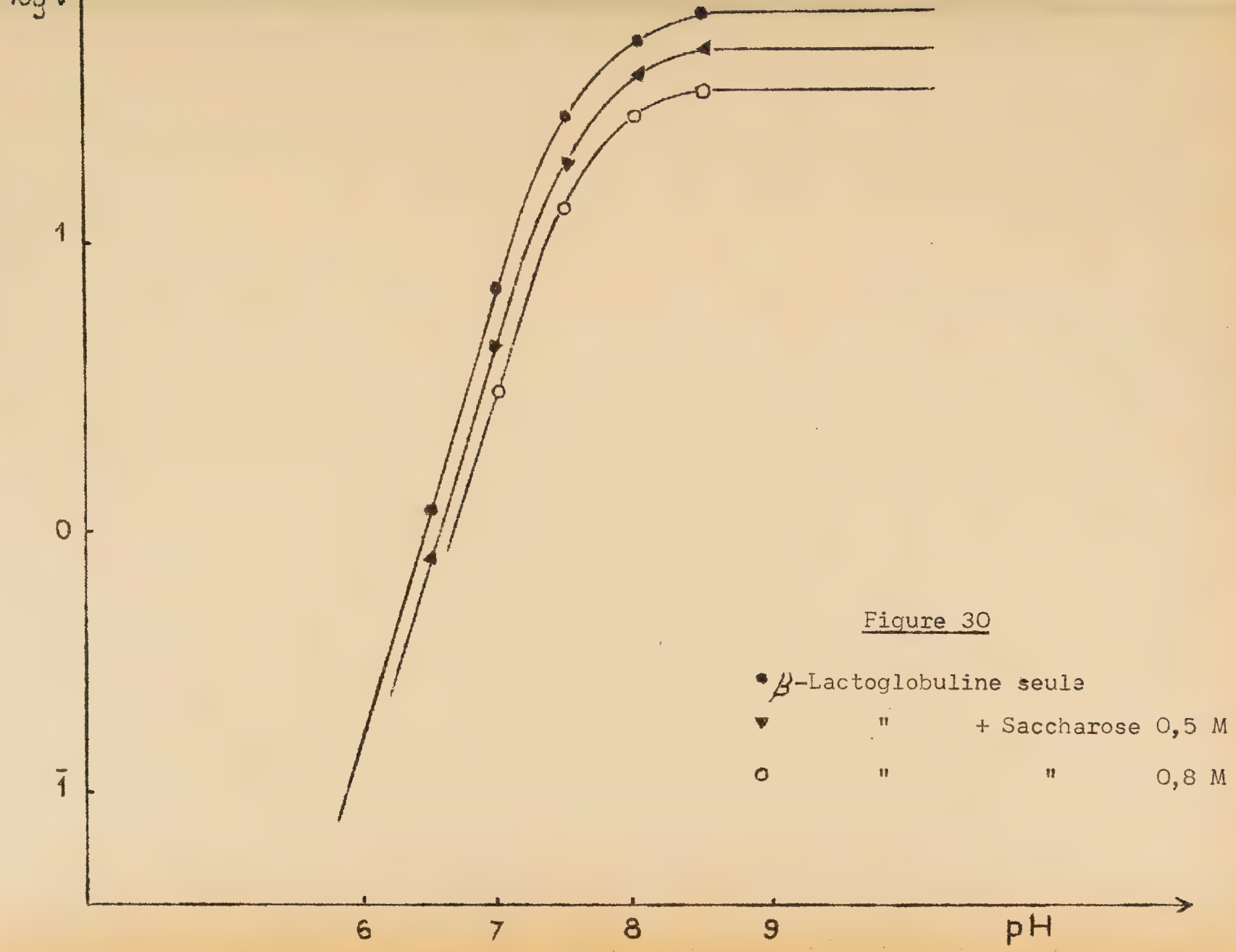


Figure 30

TABLEAU XI

Influence du pH sur l'inhibition

pH	i	
	pour Saccharose 0,5 M	pour 0,8 M
6,5	38 %	100 %
7	36 %	56 %
7,5	30 %	54 %
8	2I %	45 %
8,5	25 %	47 %

$$\Delta G = RT \text{ Log } K = \Delta H - T\Delta S$$

ΔG = variation d'énergie
K = constante de dissociation
ΔH = variation d'enthalpie
ΔS = variation d'entropie

Cette relation peut s'appliquer à K_m lorsque K_m représente une constante d'équilibre.

La théorie des vitesses absolues, en supposant qu'il existe un équilibre statistique entre les molécules d'un complexe et les molécules de ce même complexe qui sont activées, nous donne une autre relation qui fait intervenir la constante de vitesse k de la réaction envisagée :

$$\Delta G^{\ddagger} = - RT \text{ Log } \frac{h\ k}{\underline{k}\ T} = \Delta H^{\ddagger} - T\Delta S^{\ddagger}$$

$\underline{k}$ = constante de BOLTZMANN ; h = constante de PLANCK ; k = constante de vitesse.

Dans une réaction enzymatique à étapes successives, l'effet global de la température sera la somme des effets séparés sur chacune des étapes que l'analyse cinétique ne nous permet pas de différencier. Nous pouvons atteindre K_m et V_m mais ces constantes n'ont de signification physique que dans certains cas favorables où l'une des étapes est limitante par rapport aux autres.

A ces constantes cinétiques correspondent des constantes thermodynamiques expérimentales :

$$\Delta G^{\ddagger}_{V_m} \ ; \Delta H^{\ddagger}_{V_m} \ ; \Delta S^{\ddagger}_{V_m} \ ; \Delta H_{K_m} \ ; \Delta S_{K_m}$$

III_{61} - Conservation du phénomène d'activation par le substrat.

Le phénomène d'activation par le substrat se conserve quelle que soit la température de l'expérience, comme nous pouvons le voir sur la fig. XXXI, pour deux concentrations de Saccharose (0,45 et 0,8 M), entre 28°8 et 40°C.

III_{62} - Détermination des constantes.

III_{621} - Effet de la température sur la protéine native.

J. YON (53) et MONNOT (8) ont montré que dans le cas de l'hydrolyse de la protéine native, K_m ne varie pas avec la température.

Nous avons vérifié que K_m ne varie pas non plus avec la température en présence de deux concentrations différentes de Saccharose (fig. XXXI), alors que V_m varie.

Bien que nos expériences aient surtout été faites dans la zone où la courbe $v = f\ (v/S)$ n'est pas linéaire, on peut faire le calcul des grandeurs thermodynamiques correspondant à la valeur de K_m déterminée pour les faibles valeurs de substrat (Tableau XII).

Puisque K_m ne varie pas avec la température alors que V_m varie, nous pouvons en conclure que $k_2 \ll k_{-1}$, l'expression de K_m devient :

$$K_m = \frac{k_3\ k_{-1}}{k_1\ (k_2 + k_3)} \longrightarrow \frac{k_3\ k_{-1}}{k_1\ k_2}$$

dans le cas où $k_3 \ll k_2$

Figure 31

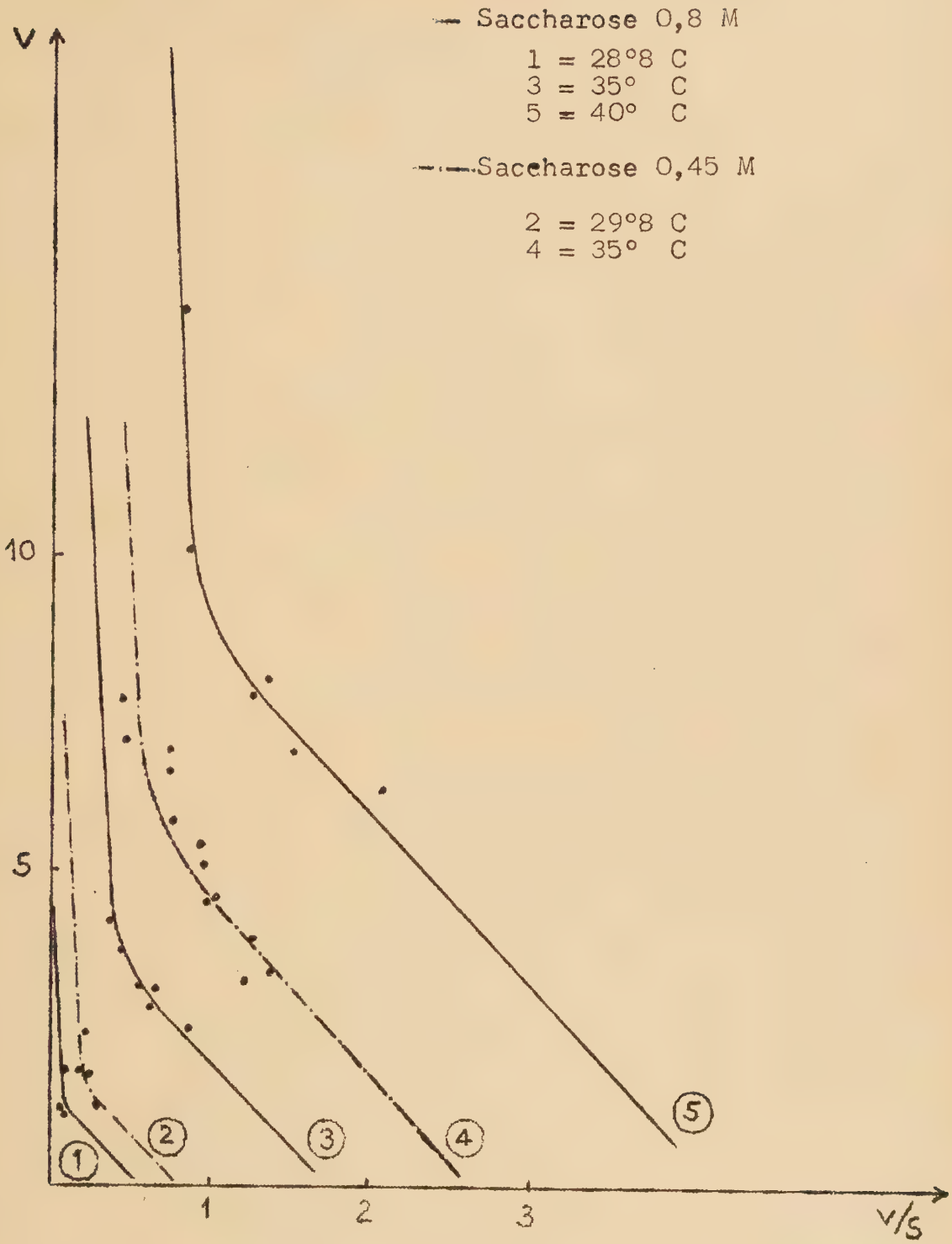

— Saccharose 0,8 M
1 = 28°8 C
3 = 35° C
5 = 40° C
—·—Saccharose 0,45 M
2 = 29°8 C
4 = 35° C
V
10
5
1
2
3
V/S
1
2
3
4
5

TABLEAU XII

Valeurs des constantes thermodynamiques correspondant à K_m à 35°C et pH = 7.

K_m = 2,7 mg/ml = $0,77.10^{-4}$ M.

ΔH cal/mole	ΔG cal/mole	ΔS u e/mole
0	- 4411 ± 50	+ 14

Les constantes thermodynamiques correspondant à K_m sont donc difficilement interprétables puisque K_m n'est pas une constante d'équilibre vraie mais une expression complexe renfermant plusieurs constantes.

Puisque K_m est constant en fonction de la température alors que V_m varie, on peut représenter log v en fonction de 1/T au lieu de log V_m (fig. XXXIII). La courbe est une droite ; on peut donc penser qu'il existe une étape limitante. En effet, ainsi que le fait remarquer J.J. BECHET (25), si les deux constantes k_2 et k_3 étaient du même ordre de grandeur avec des coefficients de température différents (et il n'y a aucune raison de penser à priori que ces coefficients soient identiques), on devrait obtenir une courbe à laquelle seraient tangents deux segments de droite. De plus, les résultats des travaux de J. YON et de ses collaborateurs amènent à penser que cette étape existe et qu'elle est dans le cas de la protéolyse de la β-Lactoglobuline A, l'étape de désacylation. V_m devient en présence de Saccharose : $k_3 \ll k_2$

$$V_m = \frac{k_3 E_t}{(1 + (I)/K_i + (I)^2/K_i^2 \delta)}$$

La pente des deux droites obtenues, l'une sans inhibiteur, l'autre avec la concentration de Saccharose $I_{0,5}$ nous permet de calculer $\Delta H^{\ddagger}$ dans les 2 cas.

Nous pouvons également calculer la valeur de k_3 pour les valeurs de S ne dépassant pas 4 mg/ml, avec les valeurs suivantes pour les autres constantes :

- PM de la Trypsine : 24.500
- $h = 6{,}62.10^{-27}$
- $\underline{k} = 1{,}38.10^{-16}$

Figure 33

- α = 0,38 et en admettant que le nombre total de liaisons rompues par molécule de β-Lactoglobuline est de 20 (Tableau XIII).

Il faut noter l'importante variation d'entropie correspondant à la présence du Saccharose : $\Delta S^{\ddagger}$ = - 12 u.e./mole. Si notre hypothèse de l'existence d'une étape limitante, l'étape de désacylation, est justifiée, nous pouvons donc penser que la fixation du Saccharose entraîne une inhibition du processus de désacylation par suite d'un changement dans la configuration du complexe ES.

Si le sucre était lié à la protéine par des liaisons hydrogènes, $\Delta H^{\ddagger}$ augmenterait en présence de sucre. Or, $\Delta H^{\ddagger}$ diminue. Il y a donc stabilisation par formation de liaisons hydro hydrophobes en présence de sucre.

Le point équitempérature obtenu par extrapolation est à + 2°C.

III_{622}- Effet de la température sur la protéine dénaturée "f".

Nous n'avons fait ici qu'une étude superficielle. En effet, même en présence de Saccharose 0,7 M, nous n'obtenons pas toujours d'inhibition. Le phénomène est faible et ne correspond peut-être pas du tout au même processus que pour la β-Lactoglobuline native.

Toutefois, nous avons vérifié que K_m ne varie ni en présence de sucre, ni avec la température (fig. XXXII). On peut donc déterminer les constantes thermodynamiques correspondant à K_m. Elles seront les mêmes que celles déterminées pour la β-Lactoglobuline "f" en absence de sucre (YON) (Tableau XIV).

Figure 32

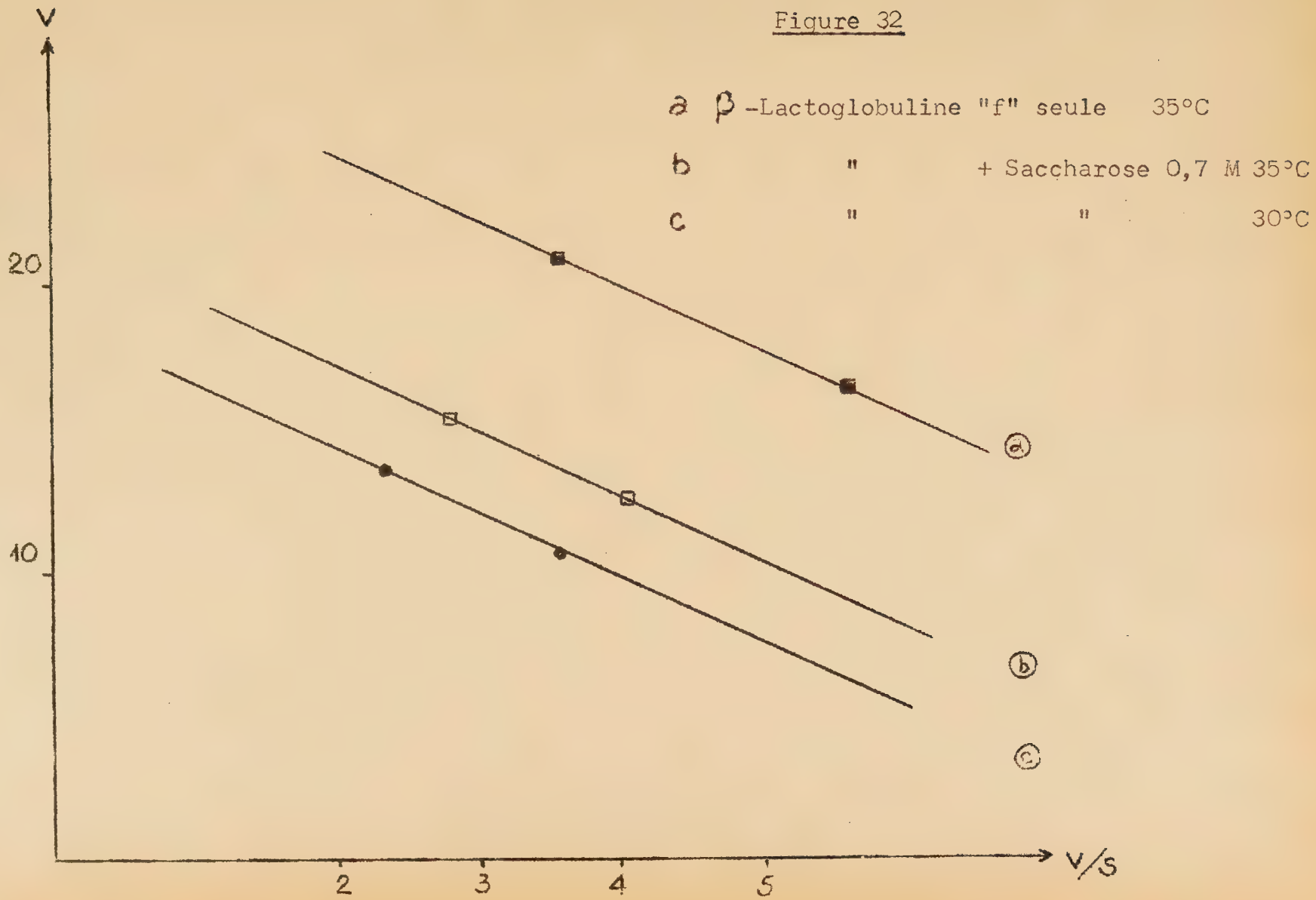

a β-Lactoglobuline "f" seule 35°C
b " + Saccharose 0,7 M 35°C
c " " 30°C
V
20
10
2
3
4
5
V/S
a
b
c

TABLEAU XIII

Valeur des constantes thermodynamiques correspondant à V_m à 35°C et pH = 7.

	$k_{3sec^{-1}}$	$\Delta H^{\ddagger}$ cal/mole	$\Delta G^{\ddagger}$ cal/mole	$\Delta S^{\ddagger}$ u.e/mole
β-Lactoglobuline A seule	0,05	33.200	20.000	42
+ Saccharose . 0,7 M		29.400	20.000	30

La figure XXXIV représente log v en fonction de 1/T en absence et en présence de Saccharose 0,7 M.

Le Tableau XV résume nos résultats qui montrent que, dans le cas de la Lacto-globuline dénaturée, il n'y a pas de variations des grandeurs thermodynamiques. La très faible inhibition observée n'est donc pas du tout le même phénomène. Elle nous permet de conclure que l'action inhibitrice du Saccharose est liée à la structure native de la protéine.

III_{623}- Détermination des constantes d'association sucre-protéine.

De l'expression de $\overline{Y}_{50}\%$ (p.29) (la saturation fractionnelle de la macromolécule par l'inhibiteur) nous pouvons tirer k_i, la constante d'association de la première molécule en fonction de γ le coefficient d'interaction.

Rappelons que $k_i = \frac{1}{K_i}$

(K_i = constante de dissociation)

$$\gamma = \frac{1}{\delta}$$

Pour $\overline{Y} = 0,5$ $I = I_{0,5}$ = la concentration en Saccharose qui donne une inhibition de 50 %

$$k_i \times I_{0,5} = k_i \times 0,7 = \frac{-1 + \sqrt{1 + 3\gamma}}{3\gamma}$$

En reportant cette expression dans celle de n (cf. p. 29) dont nous connaissons la valeur (n = 2,7), nous obtenons γ et k_i

Figure 34

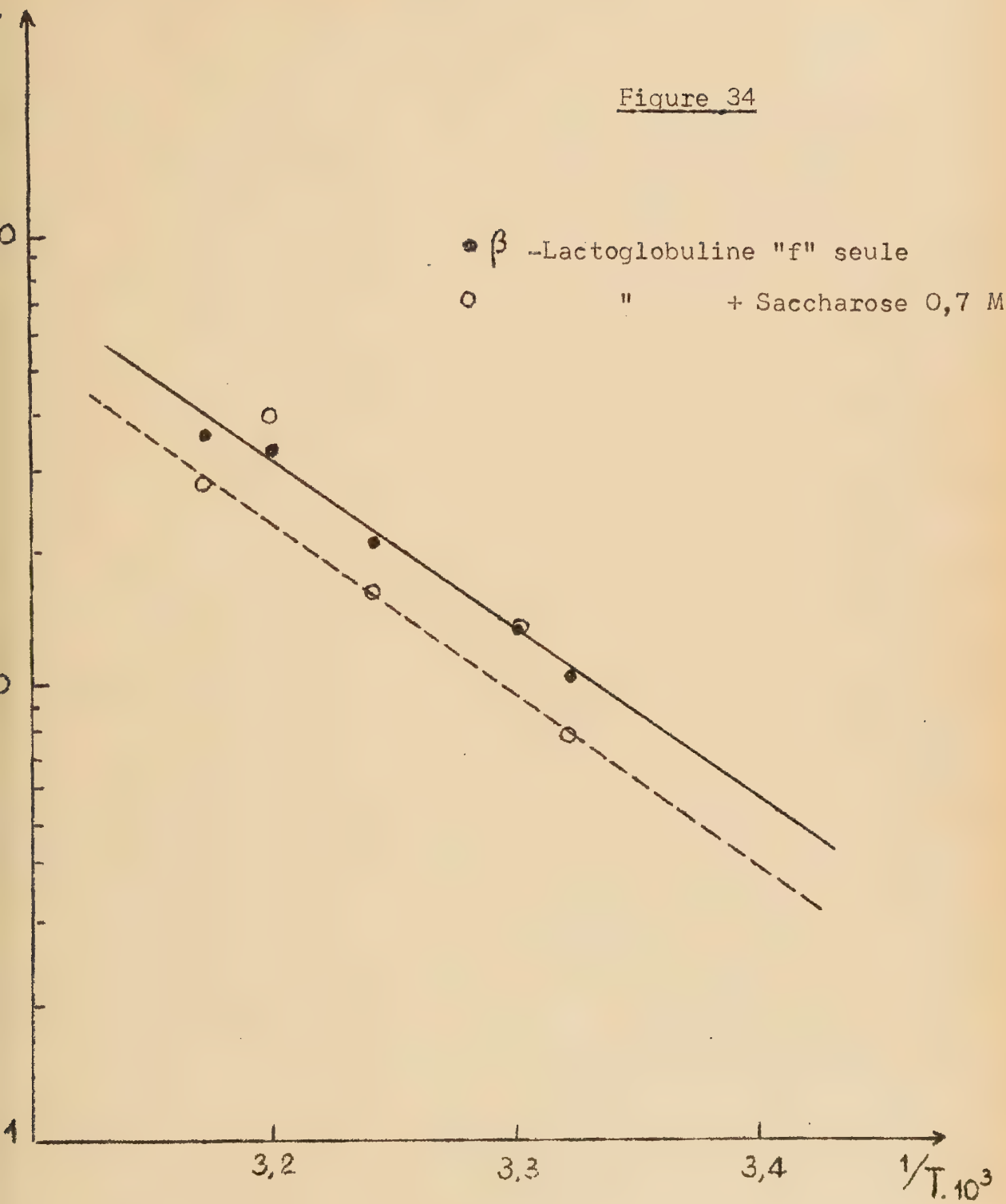


TABLEAU XIV

à 35°C et pH = 7, pour une force ionique nulle

$\Delta H)_\circ$ cal/mole	$\Delta G)_\circ$ cal/mole	$\Delta S)_\circ$ u.e/mole
0	- 6.050	20

TABLEAU XV

à 35°C et pH = 7

	k_s sec^{-1}	$\Delta H^{\ddagger}$	$\Delta G^{\ddagger}$	$\Delta S^{\ddagger}$
Lactoglobuline "f"	0,072	16.000	19.800	- 12
" + Saccharose 0,7 M		16.000	19.800	- 12

$$n = \frac{2\left[1 + 3\gamma\,(k_i\ I_{0,5})^2\right]}{1 + 2\,k_i\ I_{0,5} + \gamma\,(k_i\ I_{0,5})^2}$$

γ	=	15
δ	=	7.10^{-2}
k_i	=	$0,18\ M^{-1}$
K_i	=	5,5 M

III_7 - Action de quelques autres sucres.

Nous avons effectué quelques expériences avec d'autres sucres qui sont représentées dans la fig. XXXV. Elles montrent que d'autres sucres que le Saccharose, en particulier le Glucose et le Maltose (fig. XXXVI), sont capables de provoquer une inhibition de la protéolyse trypsique de la β-Lactoglobuline A du même ordre de grandeur que le Saccharose. En effet

$I_{0,5}$ = 0,7 M pour les trois sucres envisagés.

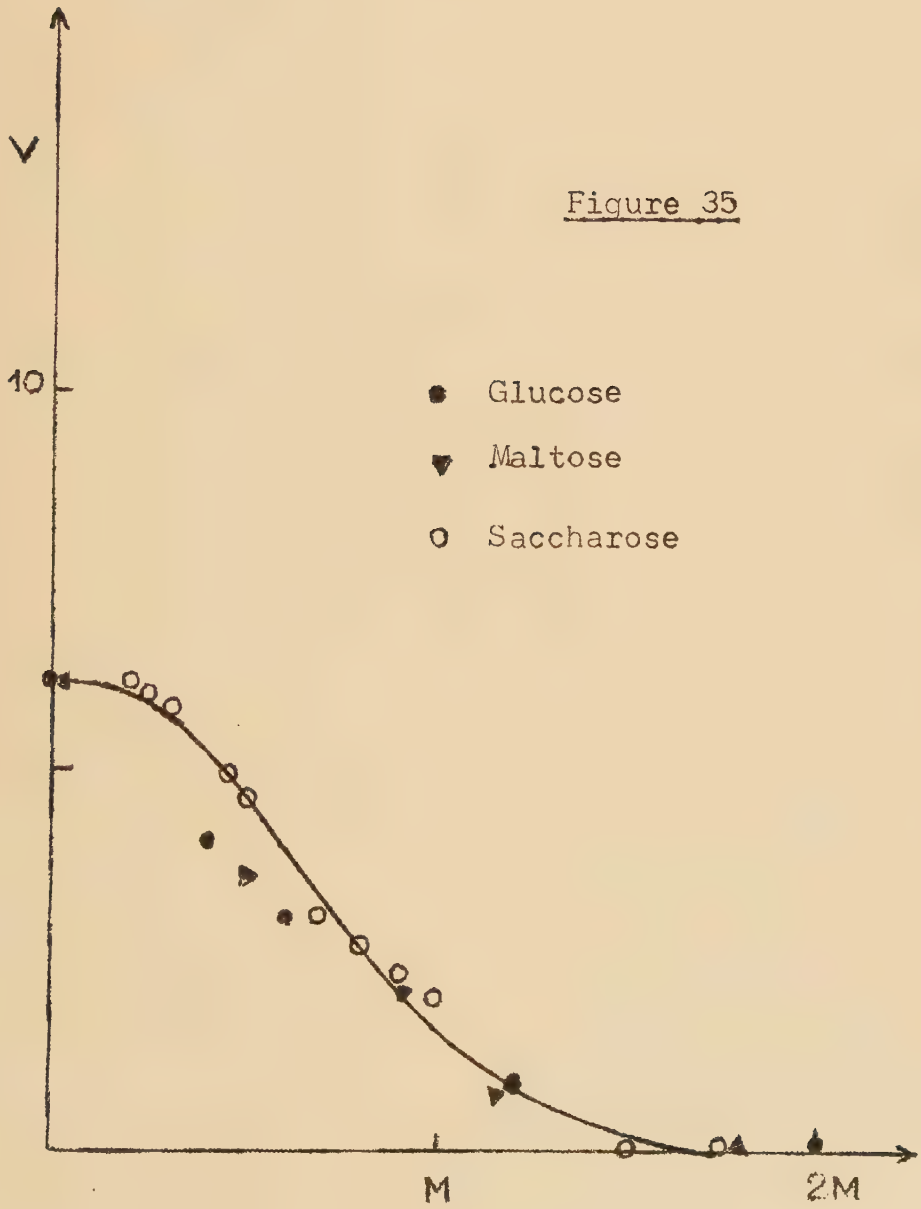
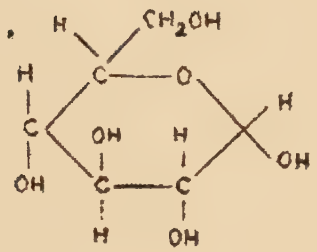


Figure 35

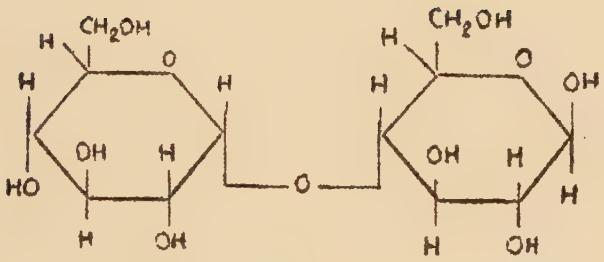
Figure 36

GLUCOSE



α D - Glucose

MALTOSE



α D-Glucopyranosyl-4 β- D-Glucopyranoside

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'étude cinétique et thermodynamique de l'action du Saccharose sur la protéolyse trypsique de la β-Lactoglobuline A à pH 7, nous a montré que cette inhibition du type totalement non compétitif, se faisait par la liaison de deux molécules de Saccharose sur la protéine substrat avec un coefficient d'interaction tel que la deuxième est beaucoup plus fortement liée que la première.

Les mesures d'équilibre de dialyse permettent d'affirmer que, seules, deux molécules de Saccharose se fixent sur la Lactoglobuline.

Le phénomène d'inhibition dépend essentiellement de la structure du substrat : il n'existe que pour des substrats protéiques et dans la mesure où celui-ci est "natif". En effet, la dénaturation de la protéine fait disparaître à peu près totalement l'inhibition.

L'interprétation la plus simple qui rende compte de tous les faits observés nous paraît être que la β-Lactoglobuline possède des propriétés allostériques : les deux molécules de Saccharose se fixent chacune sur le site correspondant du protomère dans le dimère, ce qui entraîne une interaction d'affinité homotrope et par conséquent coopérative.

Une molécule allostérique peut prendre réversiblement plusieurs états conformationnels distincts. Le Saccharose qui n'a pas la même affinité pour les deux états induit la transconformation. Celle-ci est mise en évidence sur les courbes de titrage aux pH inférieurs à pH = 6. Elle correspond à une structure plus compacte et à un masquage de certains carboxyles.

Ceci pourrait être rapproché de l'hypothèse de TIMASHEFF (54), selon laquelle il y aurait une accumulation d'acide aspartique et glutamique en un endroit précis de la surface de la molécule de Lactoglobuline qui rendrait compte du fait que 30 groupes COOH sont dissimulés lors de la formation du tétramètre. Nous observons un "masquage" de 15 COOH à pH = 3 en présence de Saccharose M.

La liaison du sucre n'est cependant pas polaire. L'étude thermodynamique nous a montré que la liaison ne se fait probablement pas par une liaison hydrogène mais plutôt par une interaction hydrophobe. Or, nous savons l'importance des liaisons hydrophobes dans le maintien de la structure native des protéines et en particulier dans celui de la Lactoglobuline qui ne comporte qu'un faible enroulement en hélice.

La diminution du facteur Entropie d'Activation dans le cas de la protéolyse en présence de Saccharose, peut rendre compte de l'interférence du sucre dans l'organisation de l'eau autour de la protéine. Il doit y avoir formation de liaison hydrophobes Protéine-Sucre, entraînant probablement une nouvelle répartition des liaisons hydrophobes dans la protéine elle-même.

Le changement de structure que ceci entraîne peut être décelé par spectrophotométrie différentielle. Une molécule de Tryptophane se démasque et entre en contact avec le solvant.

Dans la molécule dénaturée, la rupture préalable d'un très grand nombre de liaisons hydrophobes entraîne une structure beaucoup moins rigide dans laquelle la liaison éventuelle d'une ou de deux molécules de sucre devient sans influence sur la réaction enzymatique.

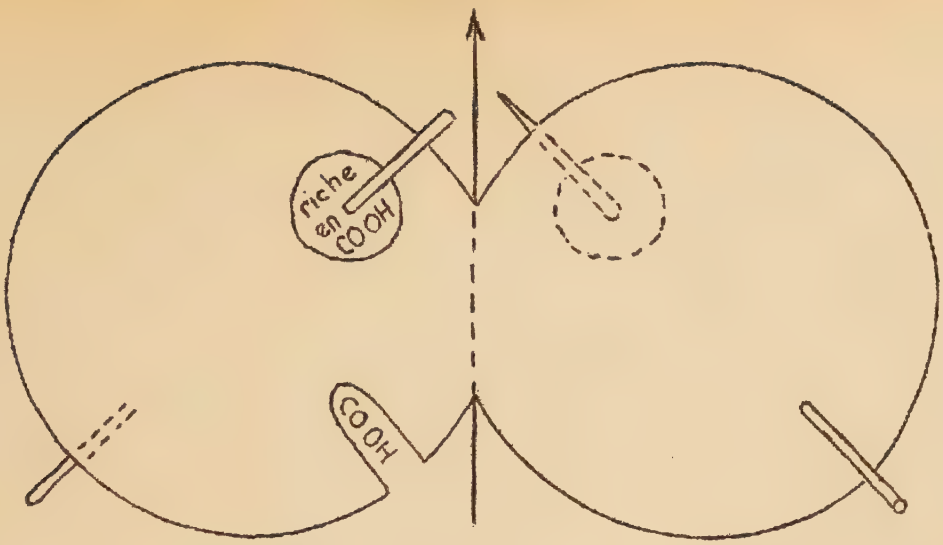
Il est intéressant de penser qu'outre les inhibiteurs compétitifs, outre les variations des conditions du milieu susceptible d'entraîner une inhibition de la réaction enzymatique, celle-ci peut être empêchée par un certain nombre d'inhibiteurs non spécifiques qui interviennent sur la structure quaternaire de la protéine substrat et sont peut-être un aspect des mécanismes de régulation. On peut tenter de représenter le phénomène par un schéma (fig. XXXVII).

D'autre part, il est classique de dire (48) que le Saccharose stabilise la structure native des protéines. S'il est en effet vrai qu'il les protège contre la dénaturation, on peut le considérer, d'après notre étude, comme un agent de transconformation. La concentration généralement employée de 20 % est particulièrement mal choisie : elle correspond en effet au demi-effet du Saccharose.

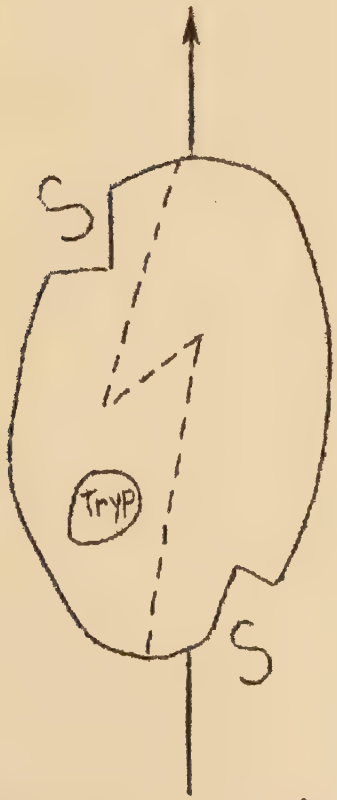
Ce phénomène, probablement très général, se retrouve avec d'autres glucosides tels que le glucose lui-même ou le maltose.

∴

Figure 37



Dimère dans son état relâché. β -Lactoglobuline selon GREEN Aschaffenbourgd (55) complété par TIMASHEFF (54)



Après la fixation de 2 molécules de Saccharose.
Dimère dans son état contraint.

B I B L I O G R A P H I E

1- WYMAN J. -
Adv. in Protein Chem. (1948) 4, 407.

2- WYMAN J. -
Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. (1963), 28, 483.

3- MUIRHEAD H. et PERUTZ M.F. -
Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. (1963), 28, 451.

4- BENESCH R. et BENESCH R.E. -
J. Mol. Biol. (1963) 6, 498.

5- MONOD J., CHANGEUX J.P. et JACOB F. -
J. Mol. Biol. (1963), 6, 306.

6- MONOD J., WYMAN J. et CHANGEUX J.P. -
J. Mol. Biol. (1965), 12, 88.

7- YON J. -
Biochim. Biophys. Acta (1958), 27, 111

8- MONNOT M. -
Thèse 3ème Cycle Paris (1963)

9- HARDT C.R., HUDDELSON I.F. et BALL C.D. -
J. Biol. Chem. (1946), 163, 211.

10- BEILINSSON A. -
Biochem. Z. (1929) 213, 299.

11- BOYER P.D., LUM F.G., BALLOU C.A., LUCK J.M. et RICE R.G. -
J. Biol. Chem. (1946), 162, 181.

12- BECHET J.J. et YON J. -
Biochim. Biophys. Acta (1964), 89, 117.

13- MONNOT M. et YON J. -
Biochim. Biophys. Acta (1964), 92, 105.

14- CHEVALIER J. et YON J. -
Biochim. Biophys. Acta sous presse.

15- JOHANNIN G. -
Thèse 3ème cycle Paris (mars 1966).

16- LAZDUNSKI M. -
Bull. Soc. Chim. Biol. (1965), 47, 301.

17- BENDER M.L. -
J. Amer. Chem. Soc. (1962), 84, 2582.

18- BENDER M.L. et KAISER E.T. -
J. Amer. Chem. Soc. (1962), 84, 2556.

19- ZERNER B. et BENDER M.L. -
J. Amer. Chem. Soc. (1963), 85, 356.

20- BENDER M.L., CLEMENT G.E., KEZDY F. et ZERNER B.
J. Amer. Chem. Soc. (1963), 85, 358.

21- BERNHARD A., LAUS J. et NOLLER A. -
Biochem. (1965), 4, 1108.

22- BRANDT K.G. et HESS G.P. -
Biochem. Biophys. Res. Com. (1966), 22, 447.

23- KRUPKA R.M. et LAIDLER K.J. -
Trans. Faraday Soc. (1960), 56, 1467.

24- ALBERTY R.A. et BLOOMFIELD V. -
J. Biol. Chem. (1963), 238, 2804.

25- BECHET J.J. -
Thèse 3ème Cycle. Paris 1964

26- PELLER A. et ALBERTY R.A. -
J. Amer. Chem. Soc. (1959), 81, 5907.

27- DIXON M. et WEBB E.C. (1958) -
"Enzymes" Acad. Press N.Y.

28- STRAUS O.H. et GOLDSTEIN A. -
J. Gen. Physiol. (1943), 26, 559.

29- HILL A.V. -
J. Physiol. (1940), 40, 4P.

30- DUPONT M. -
Thèse de Doctorat d'Etat Paris (1964).

31- PALMER A.H. -
J. Biol. Chem. (1934), 104, 359.

32- OGSTON A.G. et CECIL D. -
Biochem; J. (1949), 44, 33.

33- BRIGGS D.R. et HULL R. -
J. Amer. Chem. Soc. (1945), 67, 2007.

34- YON J. -
Bull. Soc. Chim. Biol. (1957), 39, 1163.

35- CHEESEMAN G.C. -
J. Dairy Res. (1963), 30, 17.

36- LAPORTE J.C. -
Thèse 3ème cycle Paris 1964.

37- YON J. -
Bull. Soc. Chim. Biol. (1960), 42, 209.

38- LINEWEAVER H. et BURK D. -
J. Amer. Chem. Soc. (1934), 56, 658.

39- HOFSTEE B.H.J. -
Enzymology (1956), 17, 273.

40- DIXON M. -
Biochem. J. (1953), 55, 170.

41- WEBB J.L. -
Enzyme and Metabolic Inhibitors (1963), Ac. Press N.Y.
p. 153.

42- HUNTER A. et DOWNS C.E.
J. Biol. Chem. (1945), 157, 427.

43- REINER J.M. - Behavior of Enzyme Systems (1959),
Burgess Minneapolis Minnesota p. 156.

44- KLOTZ I.M., WALKER F.M. et PIVAN R.B. -
J. Amer. Chem. Soc. (1946), 68, 1486.

45- STEINHARDT J. et BEYCHOK S. -
The Proteins vol. II 2ème édition ed. H. Neurath p. 251.

46- CHANGEUX J.P. -
Bull. Soc. Chim. Biol. (1964), 46, 947.

47- GEORGES C et GUINAND S. -
J. Chim. Phys. (1960), 57, 606.

48- HERSKOVITS T.T. et LASKOWSKI M. Jr.
J. Biol. Chem. (1962), 237, 2481.

49- HERSKOVITS T.T. -
J. Biol. Chem. (1965), 240, 628.

50- BRAND E., SAIDEL L.J., GOLDWATER W.H., KASSEL B. et RYAN F.J.
J. Amer. Chem. Soc. (1945), 67, 1524.

51- CANNAN R.K., PALMER A.H., KIBRICK A.C. -
J. Biol. Chem. (1942), 142, 803.

52- LASKOWSKI M. Jr et SHERAGA H.A. -
J. Amer. Chem. Soc. (1954), 76, 6305.

53- YON J. -
Bull. Soc. Chim. Biol. (1945), 40, 1950.

54- TIMASHEFF S.N. -
Dans symposium on Food -proteins and their reactions
ed. par H.W. SCHULTZ et H.F. ANGLEMIER (1964) chap. 9
p. I79.

55- GREEN D.N. et ASCHAFFENBURG R. -
J. Mol. Biol. (1959), 1, 54.

.
. .